

Funktionelle Modulation der Zelladhäsion durch *sud-1*  
und Galectine im *Caenorhabditis elegans* Embryo

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Matthias Müller  
aus Merzig

1. Referent: Professor Dr. Ralf Schnabel  
2. Referent: Professor Dr. Martin Korte  
eingereicht am: 27.11.06  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.02.2007

Druckjahr 2007



## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Genetik der TU Braunschweig unter der Leitung von Prof. Ralf Schnabel angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Ralf Schnabel für die guten Arbeitsbedingungen in seinem Labor und die zahlreichen weiterführenden Diskussionen.

Prof. Korte danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Prof. Geyer, PD Dr. Lochnit und Martin Schmidt danke ich für ihre Kooperation zur Untersuchung der Zellmembran assoziierten N-Glycane mit MALDI-tof.

PD Dr. Rau danke ich für die Bereitstellung eines 50L Fermenters im Biozentrum und Wolfgang Graßl danke ich für die technische Unterstützung während der Fermentationen.

Dr. Bischoff danke ich für die Unterstützung bei den *in vitro* Blastomer-Rekombinationsexperimenten.

Frau Sabine Buchmeier danke ich für ihre Zusammenarbeit zur Herstellung von monoklonalen murinen Antikörpern und für ihre hilfreichen Ratschläge.

Der Firma Devgen in Gent/Belgien danke ich für die Überlassung der cDNA-Bank aus *Caenorhabditis elegans*.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mit ihrer intensiven Fürsorge den Grundstein für eine gute Bildung und einen erfolgreichen Werdegang gelegt haben.

Zuletzt gilt mein Dank meiner lieben Frau Kerstin. Ihre Unterstützung und der von ihr gegebene Rückhalt hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## Inhalt

Zusammenfassung .....	1
Einleitung .....	2
<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>9</b>
Der <i>sud-1</i> Phänotyp .....	10
Zellbiologische Charakterisierung von SUD-1 .....	28
Was ist die molekulare Funktion von SUD-1 .....	31
Galectine in der Embryonalentwicklung von <i>C. elegans</i> .....	46
Phänotypische Analyse der Galectine mit RNA Interferenz .....	48
Die Funktion der Galectine bei der Zellteilung .....	55
Einfluss der Galectine auf die Zellsortierung .....	65
Existieren in <i>C. elegans</i> spezifische Membran-Glykosylierungen? .....	72
<b>Ausblick .....</b>	<b>76</b>
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>80</b>
4D-Mikroskopie .....	81
Entschalen von Embryonen und Mosaikembryonen .....	81
Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....	81
Kreuzungen .....	82
Flüssigkultur mit <i>C. elegans</i> .....	85
Molekularbiologische Methoden .....	87
single-worm-lysis .....	91
Klonierungen zur Herstellung der verwendeten Plasmide .....	92
Herstellung monoklonaler muriner Antikörper gegen SUD-1 .....	98
Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Galectine .....	99
Antikörperfärbung mit Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung: .....	99
Yeast-Two-Hybrid, Transformation von Hefen .....	106
Transformation von Würmern mit der Partikel Kanone .....	111
Proteinexpression in <i>E. coli</i> , Proteinextraktion und Aufreinigung .....	113
RNA-Interferenz (1): Herstellung der dsRNA .....	116
RNA-Interferenz (2): Würmer injizieren .....	116
TAP-tag-Aufreinigung .....	118
Copräzipitation mit magnetischen ProteinG-Beads .....	120
Western-Blot nach Bio-Rad® „Amplified Opti-4CN Substrate Kit“: .....	122
Western-Blot mit Chemolumineszenz-Detektion: .....	124
YAC – Rekombination .....	125
Isolierung genomischer DNA aus Hefen .....	125
<b>Referenzen .....</b>	<b>126</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>133</b>
Abkürzungen .....	133
Primerliste .....	134
Tabellen .....	137

## Zusammenfassung

Strikt maternale Mutationen in dem Gen *sud-1* bewirken eine exzessive "onkogene" Überproliferation der meisten embryonalen Zellen, die mit einer generellen stark reduzierten terminalen Differenzierung fast aller Gewebe einhergeht. Wird genetisch die Zellzahl normalisiert, nimmt die Zahl der differenzierten Zellen wieder stark zu, was nahelegt, dass der "onkogene" Defekt durch eine fehlgeleitete Proliferationsregulation am Ende der Embryogenese verursacht wird..

In *sud-1* Embryonen sind die für normale *C. elegans* Embryonen typischen schicksalsspezifischen Zellmigrationen, die das ganze Embryo durchspannen, aberant. Auch mit modernsten 4D-mikroskopischen und bioinformatischen Methoden war nicht zu klären, ob der primäre Defekt in der Zellführung selbst oder in evtl. veränderten Zelldeterminationen liegt. Ein möglicherweise unterliegendes Differenzierungsmuster wird durch die exzessiven Zellteilungen verdeckt. Da die vorherige Klonierung des Gens keinerlei Hinweise auf die molekulare Funktion des Proteins ergab, wurde ein Yeast-Two-Hybrid Ansatz gewählt, um möglicherweise bekannte Interaktionspartner zu identifizieren. Mit diesem Ansatz wurden Zelladhäsion vermittelnde Galectine als Interaktionspartner von SUD-1 identifiziert. Diese wurden in *in vivo* Co-Immunpräzipitationsexperimenten verifiziert. Ein neuer monoklonaler Antikörper zeigt eine Lokalisation von SUD-1 an den interzellulären Membranen. Diese Lokalisierung steht im Einklang mit einer in einem *in vitro*- Kultursystem beobachteten reduzierten Zellhaftung der *sud-1* Blastomeren untereinander, die auf eine Funktion bei der Zelladhäsion hinweist. Dies erklärt möglicherweise auch, warum apoptotische Zellen in *sud-1* Mutanten nicht phagozytiert werden.

Es gibt mindesten zehn Galectine in *C. elegans*. Durch die Inaktivierung einzelner Gene oder von Kombinationen mit Hilfe der RNA-Interferenz und mit polyklonalen Antikörpern wurden mehrere komplexe, ineinander verwobene Funktionen der Galectine aufgedeckt. Einerseits werden einige Galectine für die Versiegelung der Zellteilungsfurche bei den Mitosen gebraucht, andererseits lassen sich dosisabhängig mit den Galectinen *lec-1*, *lec-2* und *lec-4* alle phänotypischen Aspekte des *sud-1* Phänotyps phänokopieren. Dies ist ein von den molekularen Evidenzen unabhängiges Kriterium für eine funktionelle Interaktion von SUD-1 mit den Galectinen. Besonders interessant erscheint, dass auch eine Inhibition von Galectinen zu fehlgeleiteten Zellmigrationen führt. Damit ist es gut möglich, dass eine spezifische Modulation der Zelladhäsionen zumindest eine Voraussetzung für die korrekte Führung von Zellen zu ihrem Ziel ist. Die gezielten Migrationen sind Grundlage für die Musterbildung während der Embryogenese von *C. elegans*. Die Funktion von Galectinen für Vertebraten wurde weitgehend durch Zellkulturstudien untersucht. Das hier vorgestellte System erlaubt es nun, die Funktion der Galectine *in vivo* im lebenden Organismus zu untersuchen.

## Einleitung

Für die Entwicklung von lebensfähigen mehrzelligen Organismen ist eine intakte Zelladhäsion von entscheidender Bedeutung. Sie ist für den Zusammenhalt der Zellen in bestimmten Geweben und für Zell-Zell-Interaktionen, die Zellmigration und die Zellteilung essentiell. Durch zahlreiche Genom-Sequenzierungsprojekte und Protein-Datenbanken wurde die starke Konservierung der während der Embryonalentwicklung benötigten Proteine deutlich. Grundlegende Prozesse der Embryogenese wie der programmierte Zelltod (Ellis *et al.* 1986) oder der binäre Code der Entwicklung (Kaletta *et al.* 1997) sind bei *Caenorhabditis elegans* erstmals beschrieben worden, und Homologie der beteiligten Proteine regulieren diese Prozesse in anderen Organismen (Shelton und Bowermann 1996, Ishitani *et al.* 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zelladhäsion in *C. elegans* wie in den anderen Organismen etabliert und reguliert wird. Studien über die Zelladhäsion oder Zellmigration beziehen sich in *C. elegans* meist auf adulte Nematoden, Larven oder weit entwickelte Embryonen während der Morphogenese und geben keine Erkenntnis über die Migration und Teilung embryonaler Blastomeren vor der Morphogenese (Cox *et al.* 2004).

Um die Komplexität der Embryogenese und den daran beteiligten Genen im frühen *C. elegans*-Embryo zu erforschen, hatte mein Mentor Ralf Schnabel und seine Mitarbeiter Anfang der 80er Jahre, als noch wenig über die embryonale Entwicklung bekannt war, angefangen systematische Mutantenlesen durchzuführen. Es sollten Gene auf den Chromosomen II-V gefunden werden, die für die Entwicklung des Embryos von Bedeutung sind. Mit den dabei gefundenen Mutanten wurden viele Aspekte der Entwicklung von *C. elegans* aufgedeckt (z.B. Vatcher *et al.* 1998, Granato *et al.* 1994, Okkema *et al.* 1997, Schnabel *et al.* 1991). In dieser Arbeit wird die Funktion eines Gens untersucht, das in diesen Lesungen gefunden wurde. Vier maternal letale Mutationen führen dazu, dass mutante Embryonen 1,5 bis 2 mal mehr Zellen bilden als der Wildtyp. Deshalb wurde das Gen *sud-1* genannt (supernumerary cell divisions). Ralf Schnabel hat mich auch dadurch motiviert, an diesem Gen zu arbeiten, indem er postulierte, es könnte sich um ein rezessives Onkogen handeln, wodurch es von genereller und auch biomedizinischer Relevanz sein könnte. Trotz der überzähligen Zellzahl ist die Anzahl der Zellen, welche gewebespezifische Markerproteine exprimieren, auf bis zu 20% von der Anzahl im Wildtyp reduziert. Eine Ausnahme bilden Nervenzellen, deren Anzahl im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht ist. Thomas Wilm konnte bei der Klonierung des *sud-1* Gens (Wilm, 1998, Dissertation) die vier *sud-1* Allele *t1115*, *t1201*, *t1237* und *t1242* einem offenen Leseraster (T21B10.3) auf Chromosom II zuordnen, das für ein 130 kDa großes Protein codiert. Die vier unterschiedlichen Allele dieses Gens bestehen jeweils aus einer Punktmutation, welche ein STOP-Kodon erzeugt. Das am weitesten N-terminal liegende Allel (*t1242*) produziert von allen Allelen die längste Version des mutierten Proteins, führt jedoch auch zum stärksten Phänotyp. Die Klonierung ergab keine Erkenntnisse über die Funktion des Gens, da in der von T21B10.3 kodierten Proteinsequenz keine be-

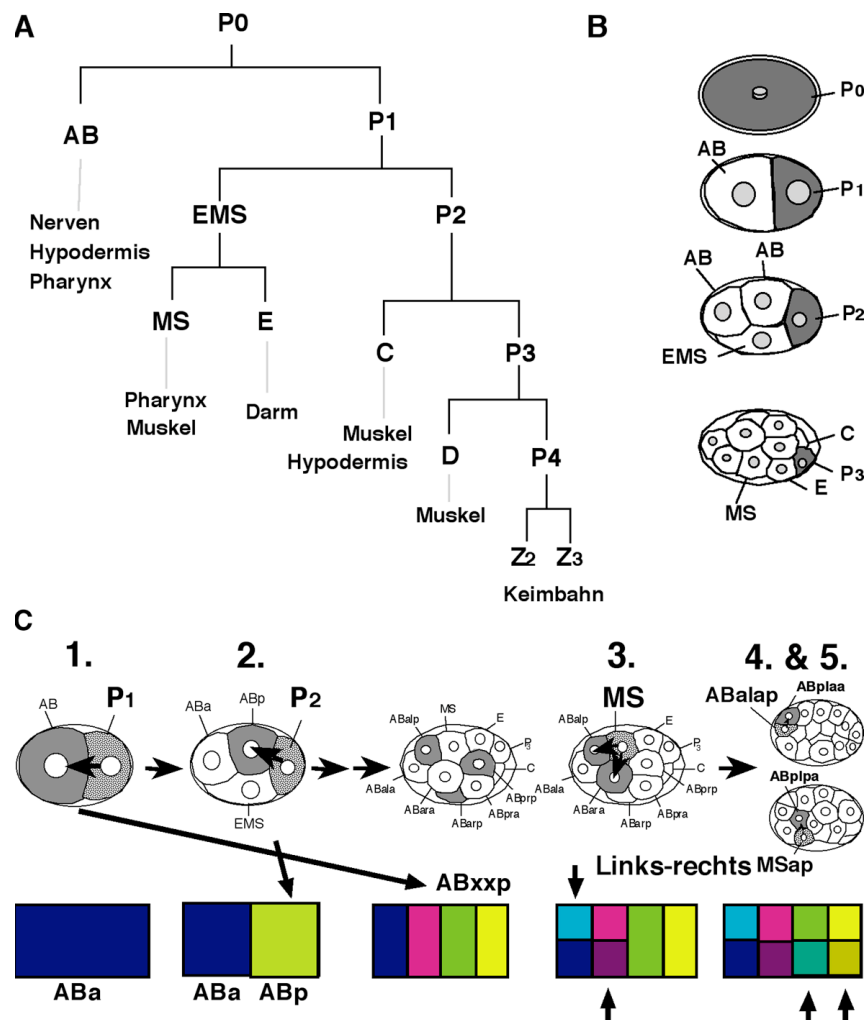
kannten Proteindomänen erkennbar sind. Homologievergleiche der Proteinsequenz in Proteindatenbanken zeigen nur das Protein selbst und keine signifikanten Homologien zu Proteinen aus anderen Organismen. Daher galt SUD-1 lange Zeit als *C. elegans* spezifisch. Einige Experimente, die R. Schnabel und T. Wilm zur phänotypischen Charakterisierung der *sud-1* Mutanten durchführten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit wiederholt und deren Resultate reproduziert. Zusätzlich wurden weitere Analysen durchgeführt, um den Phänotyp der *sud-1* Mutante detaillierter zu beschreiben. Im Folgenden werden die Embryonen von in dem maternal wirkenden Gen *sud-1* homozygot mutanten Hermaphroditen als *sud-1* mutante Embryonen, *sud-1* Mutanten oder *sud-1* Embryonen bezeichnet.

## Hintergrund zur Embryonalentwicklung von *Caenorhabditis elegans*

Der von *sud-1* hervorgerufene embryonal letale Phänotyp ist erst in einer späten Phase der Embryonalentwicklung sichtbar. Es ist möglich, dass der eigentliche Defekt durch die Mutation schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryogenese auftritt, was im Laufe dieser Arbeit diskutiert wird. Da *C. elegans* eine von Individuum zu Individuum reproduzierbare Zelllinie hat, kann die Entwicklung mutanter Embryonen mikroskopisch mit der von Wildtyp Embryonen verglichen werden. Die Wildtyp-Zelllinie wurde von Sulston und seinen Mitarbeitern 1983 publiziert (Sulston *et al.* 1983). Einleitend werden die wichtigsten Ereignisse während der frühen Entwicklung vorgestellt.

In jedem Wildtyp-Embryo erfolgt reproduzierbar stets das gleiche Teilungsmuster und die frühen Blastomeren bringen immer die gleichen Differenzierungsmuster hervor. Die Festlegung dieser Differenzierung erfolgt grob durch die Etablierung einer speziellen Topologie im frühen Embryo. In der ersten Zellteilung entstehen durch unterschiedlich starke Kräfte am Spindelapparat (Grill *et al.* 2001) und durch die Verteilung der Membran assoziierten PAR-Proteine asymmetrisch die größere somatische AB-Zelle und die kleinere P<sub>1</sub>-Zelle (Nance 2005). Die Weitergabe des Keimbahn spezifischen Transkriptionsfaktors PIE-1 ausschließlich an die posteriore Zelle ermöglicht in P<sub>1</sub> die Aufrechterhaltung des Keimbahnschicksals (Tenenhaus *et al.* 1998). Im weiteren Verlauf der Zellproliferation wird das Keimbahnschicksal nach asymmetrischen Zellteilungen der Keimbahnvorläuferzellen auf gleiche Weise mit PIE-1 aufrechterhalten, die AB-abgeleiteten Zellen teilen sich hingegen stets symmetrisch. In den ersten vier Teilungen entstehen die Keimbahnvorläufer P<sub>0</sub> bis P<sub>4</sub> und die somatischen Vorläufer AB, MS, E, C und D. In den AB-Zellen wird durch Induktionen über spezielle Zell-Zell-Kontakte ein typisches Differenzierungspotential determiniert (Abb. 1). In der AB-Zelllinie erfolgen bis zum 12-Zell-Stadium fünf Induktionen, welche die acht unterschiedlichen Identitäten der AB-Nachkommen spezifizieren. Die erste Induktion geht im 2-Zell-Stadium von der P<sub>1</sub> Zelle aus und polarisiert die AB-Zelle in eine anteriore und eine posteriore Hälfte. Die anterior-posterior-

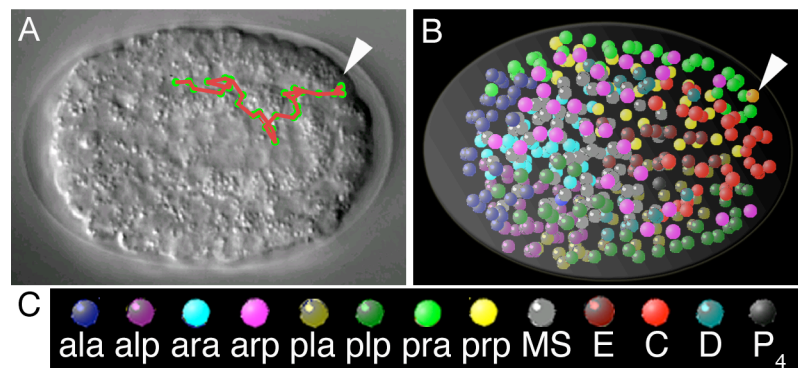
Identitäten der AB-Zelllinie werden festgelegt, indem durch eine zweite Induktion im 4-Zell-Stadium die P<sub>2</sub>-Zelle in der sie berührenden AB-Tochter die posteriore Identität induziert. Die anteriore AB-Tochterzelle behält die anteriore Identität, und die Äquivalenz der beiden AB-Nachkommen ist aufgehoben (ABa und ABp). Nach zwei weiteren Teilungen entstehen aufgrund der ersten Induktion die AB-Nachkommen ABa-xa und ABa-xp. Die MS-Zelle induziert in einer dritten Induktion die links-rechts-Achse, indem sie in den sie berührenden Zellen die Identitäten ABara und ABalp induziert. Die AB-Zellen, die MS nicht berühren, behalten eine Art Grundschicksal ABala und ABarp. Zwei weitere Induktionen bestimmen die Links-rechts-Asymmetrien in der ABp-Zelllinie, und es entstehen die acht AB-Schicksale ABala, ABalp, ABara und ABarp, ABpla und ABplp sowie ABpra und ABprp. An diese AB-Identitäten sind charakteristische Differenzierungsmuster (Abb. 1) gekoppelt.



**Abb. 1:** Die Differenzierung der Blastomeren im *C. elegans* Wildtyp-Embryo. (A) Die frühe Zelllinie im *C. elegans* Embryo und das Differenzierungspotential der jeweiligen Blastomeren. (B) Die asymmetrischen Zellteilungen der Keimbahn Vorläuferzellen P<sub>0</sub> bis P<sub>4</sub> und die Bildung somatischer Blastomeren. (C) Die fünf Induktionen und die Gewebe, die aus den jeweiligen AB-Zelllinien gebildet werden.

Bis zum Ende der Proliferationsphase mit 400-500 Zellen führen die Zellen gezielte Zellmigrationen aus, um an terminalen Positionen im Embryo zu gelangen.

Ein Vergleich von mehreren Wildtypembryonen über den Verlauf der Proliferationsphase zeigt, dass die Zellpositionen früh im Embryo (im 12-Zell Stadium) sehr ähnlich sind, dass diese Ähnlichkeit im Laufe der Proliferation abnimmt und zum Ende der Proliferation wieder zunimmt (Schnabel *et al.* 2006, Abb. 13). Die Embryonen streben also stets das gleiche prämorphogenetische Stadium an, die Wege der Zellen zum Erreichen dieser Position sind jedoch von Embryo zu Embryo unterschiedlich. Das determinierte Differenzierungspotential der Zellen (im weiteren Verlauf „Schicksal“ genannt) bestimmt demnach das Ziel der Zellen, jedoch nicht exakt den Weg dorthin (Schnabel *et al.* 2006). Das prämorphogenetische Stadium ist in allen Wildtyp Embryonen gleich (Abb. 2, Tab. 1) und zeigt für jede AB-Zelllinie eine typische regionale Anordnung der Blastomeren. Nach der neunten Zellteilungsrunde haben die Zellen in dem so genannten prämorphogenetischen Stadium ihr Ziel erreicht, differenzieren aus und die Morphogenese des Wurmes beginnt.



**Abb. 2:** Die Zellmigrationen und endgültigen Positionen der embryonalen Blastomeren in Wildtyp Embryos vor Beginn der Morphogenese, (A) Nomarskiaufnahme eines Wildtyp-Embryos. Die Strecke der am weitesten nach posterior migrierten Zelle der ABarp-Zelllinie ABarpappppp (Pfeil) ist mit der Software SIMI®BioCell als rot-grüne Linie markiert. (B) 3D Repräsentationen der Zellen im Wildtyp-Embryo und die Position der Zelle ABarpappppp (orange, Pfeilkopf). (C) Farbcode der acht AB-Spezifikationen und der aus der P-Zelllinie abgeleiteten Blastomeren und Keimbahnvorläufer. Die Nachkommen einer bestimmten Vorläuferzelle bleiben stets zusammen und bilden charakteristische Regionen im Embryo, die sich durch aktive Zellmigration z.T. über das gesamte Embryo erstrecken (arp, pla, plp, pra, prp).

In dieser Arbeit konnte ein weiterer Aspekt des *sud-1* Phänotyps erkannt werden. Die embryonalen Zellen in *sud-1*-Embryonen weisen nicht nur überzählige Zellteilungen auf, sondern auch eine defekte Migrationsführung im Embryo. Die Mutation in *sud-1* führt demnach zu einem Tumor-ähnlichen Verhalten der Zellen im Embryo. Typisch für Tumore sind Defekte in der Zelladhäsion und Zellmigration (Bewick und Lafrenie, 2006), was die Vermutung nahe legt, dass das SUD-1 Protein eine Rolle in einem dieser Prozesse spielen könnte. Es folgt daher ein Überblick über die wichtigsten in Vertebraten, *C. elegans* und *Drosophila* bisher bekannten Mechanismen, welche die Prozesse der Zelladhäsion und Zellmigration regulieren.

## Hintergrund zur Zelladhäsion und Zellmigration

Bei den <focal adhesions> (FA) bilden in den <adherence junctions> Membranverankerte Integrine über Laminin eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix (ECM) und dem Actin des Zytoskelett. Eine Reihe weiterer Proteine wie z.B. Paxillin,  $\alpha$ -Actinin, Vinculin, Talin und FAK sind an den FA lokalisiert (Cox *et al.* 2004). Für die Migration der Zellen werden die Verankerungen der <adherence junctions> mit speziellen <focal adhesion kinases> (FAK) gelöst. Eine Stabilisierung der Mikrotubuli durch Proteine der Rho GTPasen cdc42, Rac-1 und RhoA führt zur Polarisierung des Zytoskeletts. Der Abbau des Actingerüsts am hinteren Ende und der Aufbau des Actingerüsts am vorderen Ende der Zelle führt zur Migrationsbewegung in eine bestimmte Richtung (Fukata *et al.* 2003). In *C. elegans* wurden bereits viele Homologe dieser Proteine identifiziert, z.B. HFN-1 (=  $\alpha$ -Actinin), DEB-1 (=Vinculin) (Barstead 1991) oder CeCDC-42 und CED-10 (=Rac-1) (Chen *et al.* 1996), sowie PAT-2 (=  $\alpha$ -Integrin) und PAT-3 (=  $\beta$ -Integrin) (Kynes *et al.* 1992). Ihre Funktion während der frühen Embryogenese von *C. elegans* von der Zygote bis zum Beginn der Morphogenese konnte aber noch nicht gezeigt werden.

Die so genannten <apical junctions> zwischen den Epithelzellen (Darm, Hypodermis, Pharynx, Vulva) bestehen aus Cadherin/Catenin-Komplexen, in denen das Transmembranprotein Cadherin die ECM über das intrazelluläre  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin an das Actin-Zytoskelett verankert (Cox *et al.* 2004). Auch hier sind alle Komponenten in *C. elegans* bekannt: HMR-1 (=Cadherin), HMP-2 (=  $\beta$ -Catenin) und HMP-1 (=  $\alpha$ -Catenin) (Pettitt *et al.* 2003). Und obwohl die Inaktivierung der Cadherine und Catenine die Zelladhäsion während der frühen Embryogenese anderer Modellorganismen zerstört, hat sie auf die frühe Embryogenese von *C. elegans* keinerlei Auswirkung (Cox *et al.* 2004).

Letztlich vermittelt der Dystrophin-Glycoprotein-Komplex (DGC) die Zelladhäsion während der Muskelkontraktion in höheren Organismen (Champbell 1995), und auch hier existieren in *C. elegans* homologe Strukturen (Grisoni *et al.* 2001).

Die bekannten Mechanismen der Zelladhäsion und Zellmigration scheinen in *C. elegans* erst während oder nach der Morphogenese benötigt zu werden, z.B. um während dem Zusammenschluss der Hypodermis (ventral enclosure) die Hypodermiszellen zusammenzuhalten (Williams-Masson *et al.* 1997), oder um wahrscheinlich über das Homolog der Laminin  $\alpha$ B Untereinheit UNC-52 die Muskelzellen an der Basalmembran von *C. elegans* zu befestigen (Huang *et al.* 2003).

Da *C. elegans* ein transparenter Organismus mit relativ geringer Zellzahl ist und von Individuum zu Individuum reproduzierbare Migrationen bestimmter Zellen aufweist, ist dieses Tier ein geeignetes Studienobjekt für Zellmigrationen. Es konnten bereits Prozesse aufgeklärt werden, die denen in höheren Organismen ähnlich sind. Zum Beispiel reguliert in der Larve das Protein UNC-115 im Rac-1-Signalweg die Bildung von Lamellipodien und Filopodien für die Migration von Nervenzellen (Young *et al.* 2005).



Es wurden Prozesse der Zellmigration entdeckt, die u.a. von Proteinen der <fibroblast growth factor> Familie (FGF- $\beta$ ) reguliert werden. Die Migration der <sex myoblast>-Zelle (SM) in *C. elegans* vom posterioren Ende des Nematoden in das Zentrum der sich entwickelnden Gonade wird durch den FGF- $\beta$ -Liganden EGL-17 und den FGF- $\beta$ -Rezeptor EGL-15 reguliert (Burdine *et al.* 1998).

Eine globale Führung von Zellen bzw. Axonen entlang der dorsal-ventral-Achse durch UNC-5 (dorsal) oder UNC-40 (ventral; Hedgecock *et al.* 1990) und entlang der anterior-posterior-Achse durch VAB-8 (posterior; Wolf *et al.* 1998) und MIG-13 (anterior; Sym *et al.* 1999) konnte gefunden werden, sowie eine HOX-Gen-vermittelte Zellmigration des Neuroblasten QL nach posterior, reguliert durch das HOX-Gen *mab-5* (Salser *et al.* 1994).

Eine Migration durch ausgestreckte Lamellipodien oder Filopodien scheint im Embryo nicht statt zu finden. Es wurde zwar erkannt, dass bei der Gastrulation die Einwanderung der beiden Darmzellen „Ea“ und „Ep“ im 24-Zell-Stadium durch die Kontraktion eines Actin-Myosin-Gerüsts auf der apicalen Seite der einwandernden Zelle erfolgt (Lee *et al.* 2003). Aber hierbei ist genauso wie bei den oben beschriebenen Zellmigrationen in *C. elegans* nicht klar, wie die Zellen ihren Weg finden und ihr Ziel erkennen. Schnabel und Mitarbeiter konnten mit Hilfe der 4D-Mikroskopie zeigen, dass eine Zellsortierung nicht nur auf kleine Regionen beschränkt ist, sondern über das gesamte embryonale Feldes erfolgt (Schnabel *et al.* 1997). Die 1963 eingeführte Hypothese der differentiellen Adhäsion, nach der die Zellen lediglich aufgrund ihrer unterschiedlichen „Klebrigkeit“ zu anderen Zellen sortieren (Steinberg 1963), eignet sich lediglich zur Erklärung von regionalen Zellumlagerungen über kurze Distanzen, kann aber nicht das Phänomen der Zellsortierung über das gesamte embryonale Feld erklären. Im 12-Zell Stadium, nach den frühen Spezifizierungen der AB-Zelllinien sortieren die Nachkommen der induzierten AB-Gründerzellen gemäß ihrer Spezifikation zu lokalen Regionen, die sich nicht vermischen. Bei Änderungen der Zellschicksale (Schicksalstransformationen) migrieren die Zellen zu den Positionen, die ihrem neuen Schicksal entsprechen. Diese Beobachtung führte zu der von Hans Meinhard formulierten Hypothese der „Zellfokussierung“. Demnach migrieren die Zellen aufgrund einer ihr eigenen Positionsinformation an eine bestimmte Position innerhalb des embryonalen Feldes, vergleichbar der isoelektrischen Fokussierung von Proteinen innerhalb eines elektrischen Feldes. Durch zahlreiche Experimente konnte Schnabel und Mitarbeiter zeigen, dass ein derartiger Mechanismus zur Sortierung der Zellen während der Embryonalentwicklung vorliegt (Schnabel *et al.* 2006). Die Zellen ordnen sich in ein korrektes Umfeld benachbarter Zellen ein. Weichen ihre Positionswerte (z.B. aufgrund von Schicksalstransformationen, unpräzisen Zellteilungen oder durch Zellverstauschungen nach mechanischer Einwirkung auf das Embryo) zu sehr von der aktuellen Position ab, so führen die Zellen Ausgleichsmigrationen durch, bis sie ihre korrekte zelluläre Nachbarschaft erreicht haben (Schnabel *et al.* 2006). Die molekulare Umsetzung dieser Zellfokussierung ist noch nicht bekannt.

Eine einfache und sehr effiziente Methode Zellmigrationen im *C. elegans*-Embryo zu untersuchen bietet die 4D-Mikroskopie (Schnabel *et al.* 1997). Viele in dieser Arbeit gezeigte Ergebnisse beruhen auf dieser mikroskopischen Methode, weswegen sie kurz erläutert wird.

## Hintergrund zur 4D-Mikroskopie

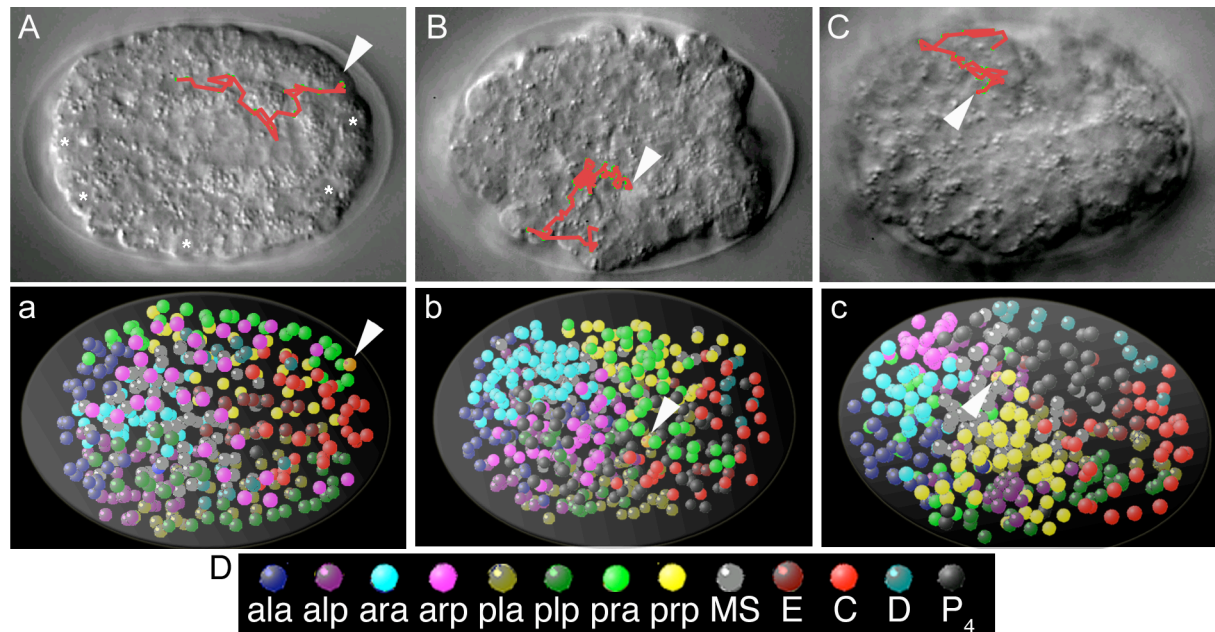
Mit der 4D-Mikroskopie kann die räumliche und zeitliche Entwicklung der Zellen in einem transparenten Embryo beobachtet werden. Ein von Anja Kristina Schulz entwickeltes Steuerprogramm reguliert die automatische Fokussierung eines Lichtmikroskops mit Normaski-Optik durch ein lebend präpariertes Embryo. Dabei werden in einem zeitlichen Intervall von 35 Sekunden die Bilder aus 25 jeweils  $1\mu\text{m}$  auseinander liegenden Fokusebenen von einer analogen oder digitalen Kamera erfasst und auf einer Festplatte gespeichert. Mit der Software SIMI<sup>®</sup>BioCell werden diese Bilder als ein in der Zeit und in den Fokusebenen steuerbarer Videofilm dargestellt, und zellbiologische Prozesse wie Zellteilung, Spindelausrichtung und Teilungswinkel sowie die Morphologie einzelner Zellen können detailliert analysiert werden. SIMI<sup>®</sup>BioCell bietet außerdem die Möglichkeit, zu jedem Zeitpunkt die Zellkerne aller Zellen sowie die Zellteilungen in dem Videofilm zu markieren und aus diesen Markierungen eine Zelllinie des aufgenommenen Embryos zu erstellen. Mit dieser können alle embryonalen Zellen den Vorläuferzellen zugeordnet und der zeitliche Ablauf der Zellzyklen erkannt werden. Aus der erhaltenen Datenbank von Zellkernpositionen und Mitoseereignissen wird eine 3 dimensionale, zeitlich und räumlich dynamische Repräsentation der Zellen generiert, mit deren Hilfe die Zellmigrationen im entwickelnden Embryo nachvollzogen werden können.

## **Ergebnisse und Diskussion**

## Der *sud-1* Phänotyp

### Das prämorphogenetische Stadium von *sud-1* Mutanten weicht vollständig von dem des Wildtyps ab.

Zunächst möchte ich den einen für diese Arbeit wichtigen Aspekt des Phänotyps, dass die Zellen im Embryo anscheinend ziellos "herumirren" in den Vordergrund stellen. Meine 4D-Mikroskopischen Analysen haben ergeben, dass sich die Zellen schon im prämorphogenetischen Stadium an falschen Positionen befinden (Abb. 3). Eine wichtige Frage ist, ob die Zellen generell unfähig sind, sich noch zu bewegen, oder ob sie nur die richtige Position im Embryo nicht finden können. Um dies zu klären wurden die Summe der Migrationsstrecken, die der gesamten Bewegung der Zellen im Embryo entspricht, und der durch die Mitosen verursachte Transport der Zellen mit der Software <phenometer> berechnet (Schnabel *et al.* 2006). Die Werte weichen kaum von denen im Wildtyp ab (Tab. 1), d.h. die Fähigkeit der Zellen sich zu bewegen ist normal. Dies macht es wahrscheinlich, dass die Führung der Zellen an ihr terminales Ziel gestört ist. Ist dies der Fall, so sollten die Zellen sich an ganz anderen Positionen befinden als in einem Wildtyp-Embryo. Eine Möglichkeit, die Ähnlichkeit zweier Embryonen miteinander zu vergleichen, basiert auf der Berechnung des RMS-Wertes (root mean square), der ein Maß für die Differenz der Zelldistanzen aller möglichen Zellpaare in zwei Embryonen ist (Schnabel *et al.* 2006). Sind die Positionen der Zellen in einem Embryo ganz anders als in dem anderen, so ändern sich entsprechend die Distanzen, was zu einem hohen RMS-Wert führt. Er gibt somit die Ähnlichkeit der inneren Ordnungen in zwei Embryonen an. Die räumliche Begrenzung der Embryonen durch die Eischale führt dazu, dass der RMS-Wert beim Vergleich zweier maximal unterschiedlicher Embryonen nicht größer als 0,25 ist (Hintze 2006). Die hohen RMS-Werte zwischen *sud-1* Embryonen und Wildtyp Embryonen (Tab. 1) zeigen, dass die Zellen in *sud-1* Embryonen andere terminale Positionen einnehmen als im Wildtyp. Die in der Einleitung dargestellte Erkenntnis, dass das Schicksal der Zellen ihre terminale Position bestimmt, macht es möglich dass in *sud-1* Embryonen entweder die Zellführung gestört ist oder die Zellschicksale so verändert sind, dass die Zellen an neue Orte migrieren. Der Vergleich von *sud-1* Mutanten zeigt, dass die Ordnung der Zellen in den Embryonen untereinander sehr unterschiedlich ist. Dies macht es unwahrscheinlich, dass in den Embryonen diskrete Zellschicksalstransformationen vorliegen.



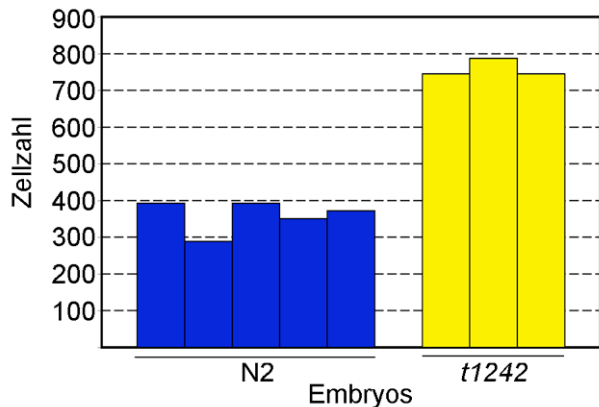
**Abb. 3:** Die Positionen von Blastomeren vor Beginn der Morphogenese. Anterior links und posterior rechts. (A,B,C) Nomarskiaufnahmen von (A) Wildtyp, und (B,C) *sud-1* mutanten Embryonen. Die Strecke der am weitesten nach posterior migrierten Zelle der ABarp-Zelllinie (ABarpapppp, Pfeilköpfe) seit Spezifizierung der ABarp-Zelle ist mit der Software SIMI®BioCell als rote Linie markiert. (a,b,c) 3D Repräsentationen der Zellen in den Embryonen A,B,C und die Position der Zelle ABarpapppp (orange, Pfeilköpfe). (D) Farbcode der acht AB-Spezifikationen und der aus der P-Zelllinie abgeleiteten Blastomeren und Keimbahnvorläufer. In *sud-1* Mutanten bilden die Nachkommen der Vorläuferzellen nicht die im Wildtyp charakteristischen Regionen. Die Zellen wandern nicht wie im Wildtyp zu den gleichen terminalen Positionen, sondern migrieren scheinbar ziellos durch das Embryo.

**Tab. 1:** Vergleich der Migrationswege, Luftlinien-Distanzen und Mitosedistanzen aller embryonalen Zellen in Wildtyp und *sud-1* mutanten Embryonen. Die Einheit ist Eilänge.

Embryo	$\Sigma$ Migrationen	$\Sigma$ Luftlinien	$\Sigma$ Mitosedistanzen	RMS vs. Wildtyp #5	RMS vs. <i>sud-1</i> #1	RMS vs. <i>sud-1</i> #2
Wildtyp #1	170	56	27	0,05	0,187	0,207
Wildtyp #2	143	50	26	0,06	0,185	0,203
Wildtyp #5	168	45	27	0	0,191	0,213
<i>sud-1</i> #1	174	40	22	0,191	0	0,210
<i>sud-1</i> #2	175	62	25	0,213	0,210	0

Es wäre aber immer noch möglich, dass die gestörte Zellsortierung einen generellen Verlust der Zellschicksale in *sud-1* Mutanten reflektiert. Nach den Erkenntnissen von Schnabel (Schnabel *et al.* 2006) sollte ein Verlust aller Zellschicksale zu einem quasi ziellosen Umherwandern der Zellen führen.

Wie schon in der Einleitung beschrieben bilden *sud-1* Embryonen zu viele Zellen. Dies konnte ich durch eine neue Analyse bestätigen (Abb. 4).



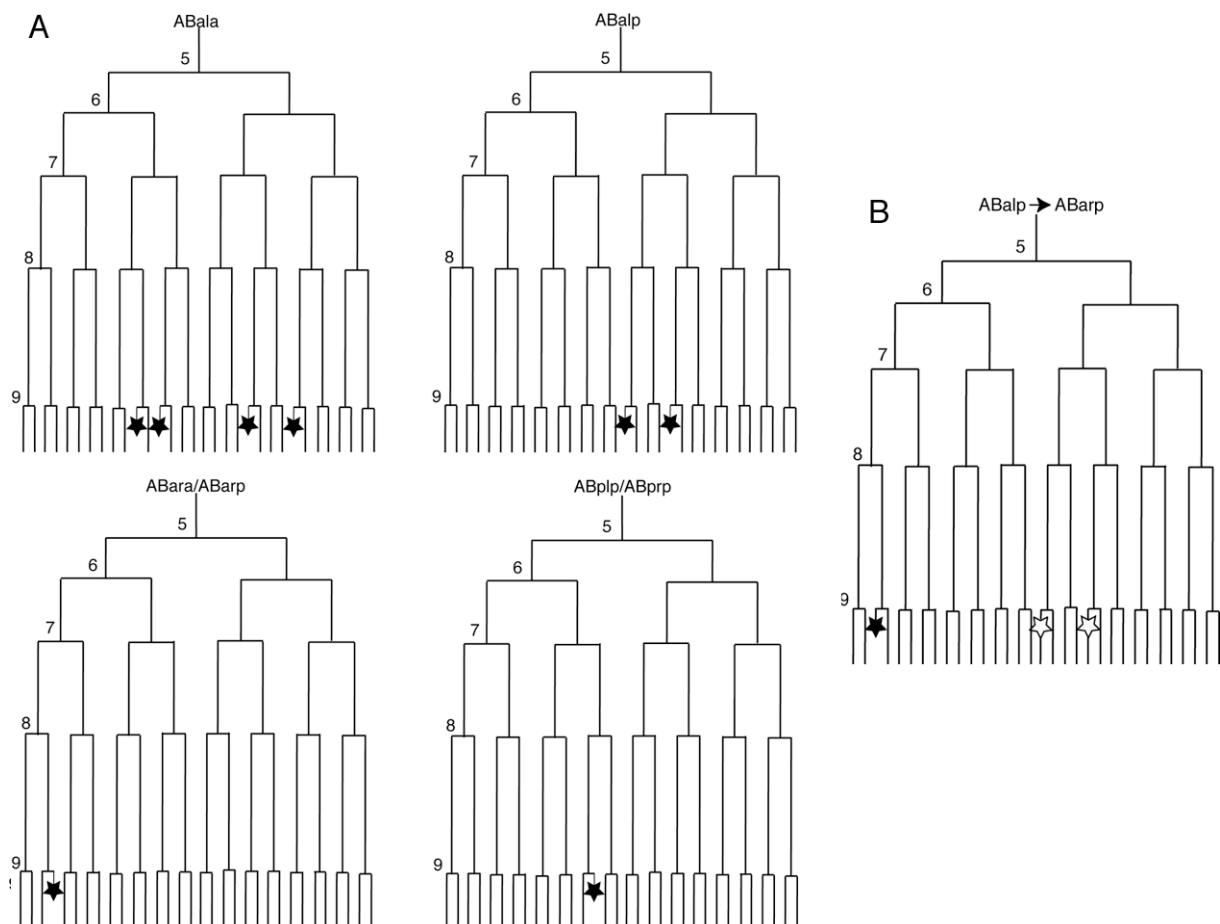
**Abb. 4:** Graphische Darstellung der Zellzahl in Wildtyp (blau) und *sud-1* Embryonen (gelb). Die Anzahl an Zellen wurde im Wildtyp (N2) nach der embryonalen Proliferationsphase und in *sud-1* Embryonen am Ende der Entwicklung nach 19-20 Std. wie später erläutert mit Hilfe einer Kalibrierkurve berechnet. In *sud-1* Embryonen ist die Zellzahl deutlich erhöht.

### Die Zelllinie von *sud-1* Embryonen ist aberrant

Eine zentrale Frage in dieser Arbeit ist, warum es zu dieser vermehrten Zellzahl kommt. Deswegen wurde die Differenzierung der Zellen durch 4D-Analysen und immunohistochemische Analysen bestimmt.

Zur Erkennung der Zellschicksale in einer 4D-Analyse ist u.a. die Morphologie der Zellen im Embryo geeignet. Zum Beispiel weisen die Hypodermiszellen im prä-morphogenetischen Stadium aufgrund ihrer Größe und Anordnung entlang des äußersten Randes des Embryos ein typisches Erscheinungsbild auf und die Nervenzellen sind auffällig klein im Vergleich zu den anderen Blastomeren. (Abb. 3A). Im *sud-1* Embryo sind derartig angeordnete Zellen nicht erkennbar (Abb. 3B). Eine zusätzliche Methode, die Zellschicksale im Embryo zu erkennen, bietet eine Analyse der Positionen aller 12 frühen Apoptosen in der gesamten Zelllinie. Die apoptotischen Zellen werden im Wildtyp in einem als Phagozytose bezeichneten Prozess von zufälligen Nachbarzellen aufgenommen und beseitigt (Hoeppner *et al.* 2001). Fallen durch Mutation bestimmte Induktionen aus, zum Beispiel wie bei der Mutation des Gens *glp-1* alle bis auf die erste, so behalten die nicht induzierten Zellen ihr Grundschicksal und es gibt nur die AB-Schicksale ABala und ABarp (Hutter *et al.* 1994). Dadurch kommt es in den nicht mehr induzierten Zelllinien an den Positionen zur Apoptose, wo sie in den normalerweise nicht induzierten Zellen ABala oder ABarp auftreten (Abb. 5). Dieses Phänomen wird als Schicksalstransformation bezeichnet und kann durch die Analyse der AB-Zelllinien erkannt werden. Die Mutation von *sud-1* ruft jedoch keine erkennbare Schicksalstransformation hervor, die die zusätzlichen Teilungen, das aberrante Differenzierungsmuster oder die veränderte Mobilität erklären können.

Die gesamte Zelllinie ist in *sud-1* Mutanten verändert (Tab. 2). Fast alle Zellen teilen sich mindestens einmal mehr und manche Zellen sterben frühzeitig und an falschen Positionen in der Zelllinie. Besonders interessant ist die Tatsache, dass nach manchen zusätzlichen Zellteilungen von im Wildtyp apoptotischen Zellen beide Nachkommen sterben, was bisher noch nie beobachtet wurde.



**Abb. 5:** Die spezifischen Positionen der Apoptosen in den AB-Zelllinien. (A) Positionen der Apoptosen in den Wildtyp-Zelllinien. (B) Neue Apoptose-Positionen durch die Schicksals-transformation ABalp zu ABarp. Die Apoptosen in ABalp (offene Sterne) treten nicht auf, stattdessen der von ABarp (gefüllter Stern).

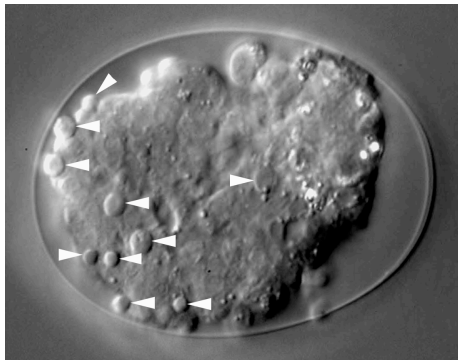
**Tab. 2:** Detaillierte Analyse der AB-Zelllinien eines Wildtyp-Embryos und von zwei *sud-1* Embryonen. Kopf: Zum Zeitpunkt mit 256-AB-Nachkommen nach der neunten Teilungsrunde sind die typischen Positionen der Apoptosen aller acht AB-Zelllinien in eine Zelllinie projiziert (Sterne). Erste Zeile der Tabelle: die AB-Spezifikation der jeweiligen apoptotischen Zelle, zweite Zeile: der ausführliche Name der apoptotischen Zelle (xxx steht für die AB-Spezifikation der apoptotischen Zelle, z.B. ala). Linke Spalte der Tabelle: die drei untersuchten Embryonen und ihre AB-Zelllinien. Die Zahlen geben an, wie viele Zellen aus der Zelle hervorgehen, die in der zweiten Zeile genannten ist (0 = Apoptose, 1 = Interphase oder Mitose+Apoptose, 2 = Mitose, 3 = zwei Mitosen). Die Zellen wurden bis zum Ende der Proliferation (Wildtyp) bzw. bis nach der 10. bis 11. Teilungsrunde (*sud-1*) analysiert. Die letzte Zeile bei den Embryonen *sud-1* #1 und *sud-1* #2 gibt an, wie viele zusätzliche Teilungen in den genannten Zelllinien insgesamt gefunden wurden. blau: es entstehen mehr Zellen als im Wildtyp, rot: es entstehen weniger Zellen als im Wildtyp. Die Zahl in den Klammern gibt an, wie viele Zellen mehr oder weniger im Vergleich zum Wildtyp entstehen. Bei Schicksals-transformationen sollten die Zahlen zweier Zeilen identisch sein. na = nicht analysiert. Es ist leicht erkennbar, dass fast alle untersuchten Zellen zusätzliche Zellteilungen durchführen.

frühe AB-Zellcode		ara arp	ala	ala	plp	alp	plp prp	alp	ala	ala	plp prp
		xxxaaapp	xxxapapa	xxxappaa	xxxappap	xxxpaaaa	xxxpaaap	xxxpaapa	xxxpapaa	xxxppaaa	xxxppapp
Wildtyp	ala	1	0	0	2	1	2	1	0	0	2
	alp	1	2	1	2	0	2	0	2	2	1
	ara	0	2	2	2	2	1	1	1	1	2
	pla	1	2	1	1	2	3	1	2	1	1
	plp	2	2	2	0	2	0	1	3	2	0
	pra	1	2	1	1	2	3	1	2	1	1
	prp	2	2	2	2	2	0	1	3	2	0
<i>sud-1</i> #1	ala	2 (+1)	2 (+2)	2 (+2)	2	3 (+2)	3 (+1)	3 (+2)	2 (+2)	1 (+1)	3 (+1)
	alp	3 (+2)	1 (-1)	2 (+1)	4 (+2)	2 (+2)	2	2 (+2)	2	2	1
	ara	1 (+1)	2	0 (-2)	3 (+1)	2	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	4 (+3)	2
	arp	3 (+3)	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	1	2 (+1)	1	2 (+1)	2 (+1)	1 (-1)
	pla	3 (+2)	2	3 (+2)	2 (+1)	2	2 (-1)	2 (+1)	2	2 (+1)	2 (+1)
	plp	4 (+2)	1 (-1)	1 (-1)	2 (+2)	2	2 (+2)	2 (+1)	3	1 (-1)	1 (+1)
	pra	3 (+1)	4 (+2)	2 (+1)	2 (+1)	3 (+1)	2 (-1)	2 (+1)	2	2 (+1)	2 (+1)
	prp	2	2	2	2	2	1 (+1)	2 (+1)	1 (-2)	2	2 (+2)
	AB:	+99	MS:	+18	E:	+14	C:	+21	D:	+4	P <sub>4</sub> : +1
<i>sud-1</i> #2	ala	0 (-1)	1 (+1)	0	2	2 (+1)	1 (-1)	2 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	2
	alp	1	2	4 (+3)	3 (+1)	2 (+2)	2	2 (+2)	1 (-1)	2	2 (+1)
	ara	2 (+2)	2	2	0 (-2)	1 (-1)	2 (+1)	1	0 (-1)	1	2
	arp	2 (+2)	2 (+1)	1	2 (+2)	1	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	1	2
	pla	2 (+1)	2	3 (+2)	3 (+2)	2	2 (-1)	2 (+1)	1 (-1)	1	1
	plp	2	2	2	2 (+2)	2	1 (+1)	2 (+1)	2 (-2)	1 (-1)	0
	pra	2 (+1)	1 (-1)	2 (+1)	2 (+1)	na	na	2 (+1)	0 (-2)	1	1
	prp	2	2	3 (+1)	3 (+1)	2	2 (+2)	2 (+1)	2 (-1)	na	2 (+2)
	AB:	+44	MS:	+5	E:	+12	C:	+3	D:	+0	P <sub>4</sub> : +0



In verschiedenen *sud-1* Embryonen ist die Identität der sich zusätzlich teilen- den bzw. apoptotischen Zellen von Embryo zu Embryo unterschiedlich und nicht re- produzierbar. Anhand der Positionen von apoptotischen Zellen kann das Schicksal der Zellen in der *sud-1* Mutante nicht erkannt werden.

Ein drittes Charakteristikum des *sud-1* Phänotyps ist, dass am Ende der Ent- wicklung die Embryonen eine stark erhöhte Anzahl an nicht aufgenommenen apop- totischen Zellen aufweisen (Abb. 6). Dies spricht dafür, dass die Phagozytose der apoptotischen Zellen in *sud-1* Embryonen gestört ist. Dieser Aspekt wird in dieser Arbeit nicht weiter behandelt.



**Abb. 6:** Ein *sud-1* Embryo am Ende der Entwicklung. Anterior links, posterior rechts. Das Embryo enthält sehr viele kleine Zellen, die Darmzellen (erkennbar an den Darmgranula) liegen an der posterioren Seite und die apoptotischen Zellen sind nicht phagozytiert worden (Pfeilköpfe).

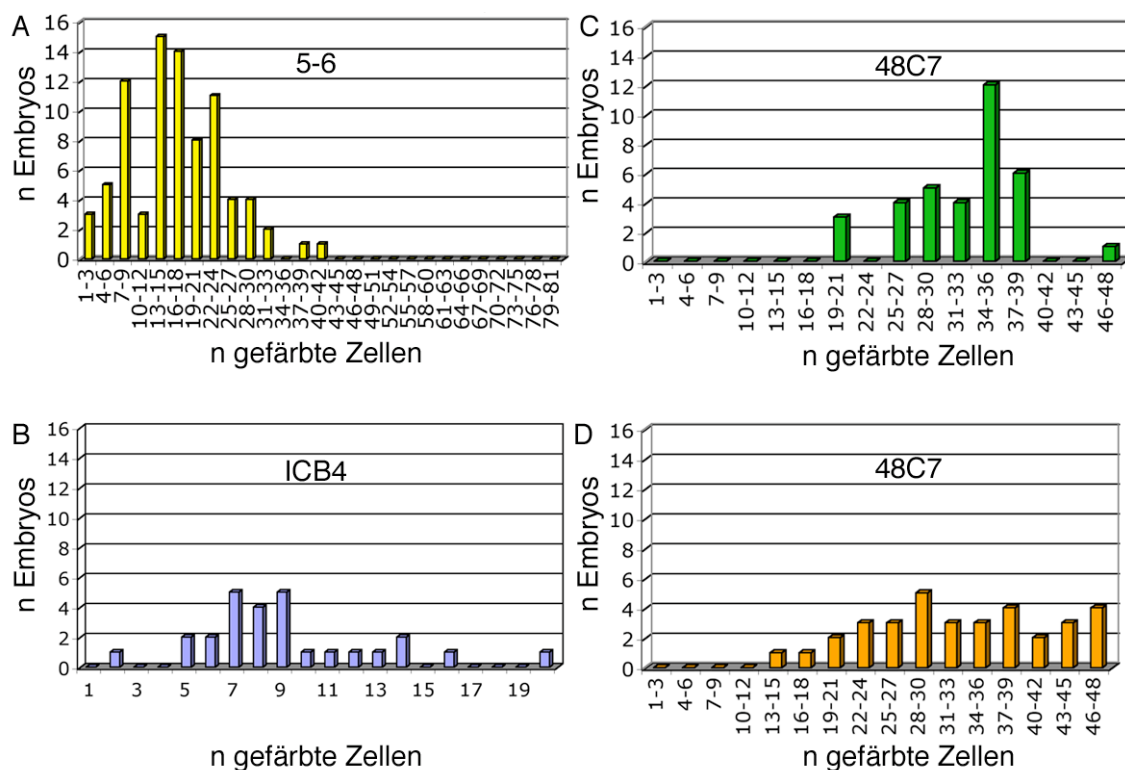
Das Schicksal der Zellen ist durch mikroskopische Betrachtungen und mit Hilfe einer ausführlichen Zelllinien-Analyse nicht erkennbar. Es könnte sein, dass eine mögliche Schicksalstransformation durch die exzessive Proliferation der Zellen über- deckt wird, und dadurch mittels Zelllinienanalyse nicht erkannt werden können. Um dies zu klären wurde eine Immunohistochemische Analyse durchgeführt und Embryo- nen mit Antikörpern gegen Gewebe spezifische Markerproteine untersucht.

### **Die terminale Differenzierung von Geweben ist reduziert. Gibt es nur ABala Schicksale?**

Es wurden mit spezifischen Antikörpern Darmzellen (ICB4), Pharynxmuskelnzellen (3NB12), Körpermuskelnzellen (5-6), und Nervenzellen (48C7) analysiert, und jeweils die Anzahl der gefärbten Zellen mikroskopisch ermittelt. Für die Darmzellen konnte eine Reduzierung auf 45,5%, für die Pharynxmuskelnzellen auf 22,9% und für die Körpermuskelnzellen auf 20,8% beobachtet werden. Nur für die Nervenzellen konnte eine Erhöhung auf 125,7% gezeigt werden (Tab. 3, Abb. 7).

**Tab. 3:** Terminale Differenzierung in *sud-1* mutanten Embryonen. Aufgelistet ist die Anzahl der gefärbten Zellen und die der analysierten Embryonen (n) im Wildtyp (N2) und in der Mutante der *sud-1* Allel *t1242* bzw. *t1115*, sowie die Anzahl in Prozent bezogen auf die Anzahl im Wildtyp.

	ICB4	5-6	3NB12 #	48C7
N2	20	81	21	33,76 ± 5,86 (n= 35)
<i>t1242</i> # <i>t1115</i>	9,11 ± 3,78 (n = 27)	16,89 ± 8,11 (n = 83)	4,81 ± 3,06 (n = 80)	42,44 ± 13,69 (n = 53)
%	45,55	20,85	22,90	125,70



**Abb. 7:** Graphische Darstellung der Differenzierungswerte aus Tab. 3: (A) Muskelzellen in *t1242* gefärbt mit 5-6, (B) Darmzellen in *t1242* gefärbt mit ICB4, (C) Nervenzellen in N2 gefärbt mit 48C7, (D) Nervenzellen in *t1242* gefärbt mit 48C7. Die graphische Darstellung der Färbung mit 3NB12 siehe Abb. 10.

Diese Beobachtungen stehen mehr oder weniger im Einklang mit der Zelllinienanalyse, die auf eine stark veränderte Differenzierung der Zellen hinweist. Erstaunlich ist eine Erhöhung der Anzahl der Nervenzellen (IL-2), die normalerweise weitgehend von der ABala-Blastomere gebildet werden. Dies kann als Hinweis gesehen werden, dass das ABala-Schicksal vermehrt im Embryo auftritt. Diese Frage wird später auch noch mit anderen Methoden untersucht werden.

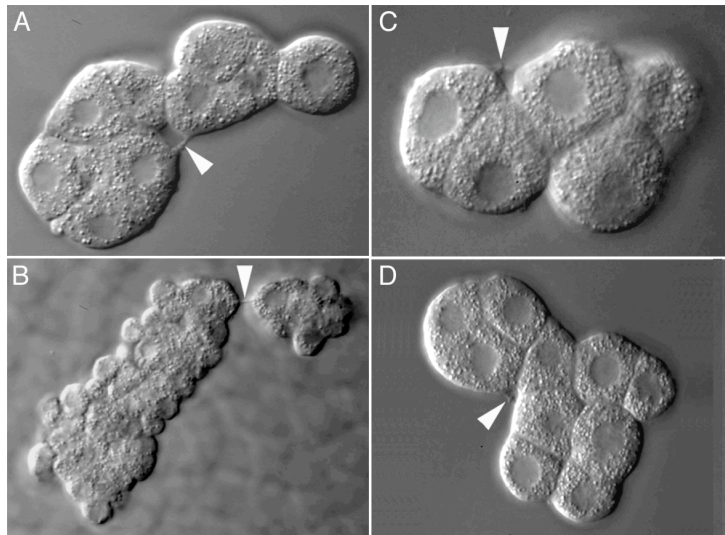
Meine ganze Arbeit wird von dem Problem durchzogen, ob das SUD-1 Protein nur an einem primären Prozess beteiligt ist und alle anderen Phänotypen dann

eine sekundäre Folge dieses gestörten Prozesses sind, oder ob das Protein immer wieder für die verschiedensten unabhängigen Funktionen gebraucht wird. So könnte es zum Beispiel sein, dass die Zelldeterminierung bis zum prämorphogenetischen Stadium "normal" ist, dann aber sekundär entgleist.

An dieser Stelle ergibt sich die Frage, welcher primäre Defekt die Ursache für die gestörte Differenzierung der Gewebe ist. Differenzieren die Zellen nicht korrekt, weil sie ein anderes oder kein AB-Schicksal exekutieren, oder differenzieren die Zellen nicht, weil ihr Austritt aus der proliferativen Phase gestört ist.

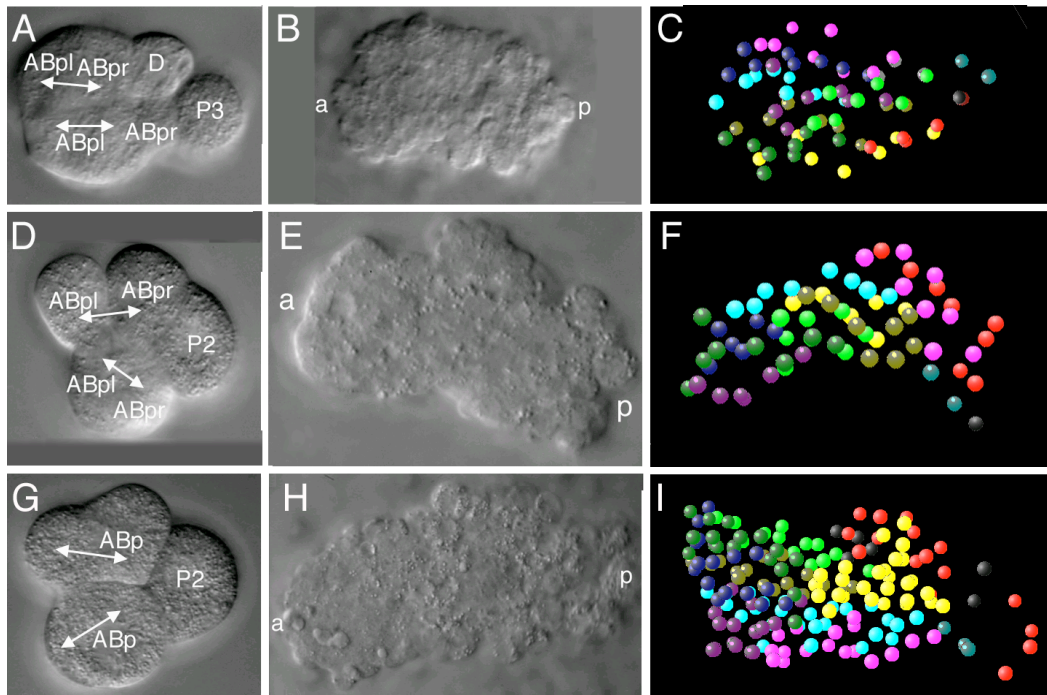
Das eben beschriebene vermehrte Auftreten des ABala-Schicksals kann als Hinweis genommen werden, dass die Spezifizierung der AB-Zelllinien, die von Induktionen der  $P_1$  abgeleiteten Zellen abhängig ist, in *sud-1* Embryonen gestört sein könnte. Eine solche Störung kann verschiedene Ursachen haben. Einen fundamentalen Effekt hätte ein Defekt der  $P_1$ -Zelllinie, von der die Schicksalsinduktionen ausgehen, die das ABala-Grundsicksal in die sieben anderen normalerweise noch vorhandenen Schicksale umwandeln (Abb. 1). Es wäre aber auch möglich, dass das *sud-1* Genprodukt nicht P-Zellen spezifisch ist, sondern in allen Zellen benötigt wird. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, wurden in *in vitro* Blastomer-Rekombinationsexperimenten *sud-1* mutante oder vom Wildtyp abgeleitete AB oder  $P_2$  Blastomeren in verschiedenen Kombinationen zusammen kultiviert. Die Frage war, ob die Kombination von AB[*sud-1*]+ $P_2$ [Wildtyp] Blastomeren wieder normale AB-Schicksale herbeiführt. Dann würde der primäre Defekt der Mutation in *sud-1* Embryonen auf fehlenden Induktionen von der  $P_2$  Zelle beruhen. Würde jedoch bei der Kombination AB[Wildtyp]+ $P_2$ [*sud-1*] in den AB-Nachkommen ebenfalls eine Schicksalsdifferenzierung auftreten, würde dies zeigen, dass in *sud-1* Embryonen die Induktion der P-Zelle nicht verhindert wird und dass die Mutation auch einen Defekt in den AB-Zellen hervorruft.

Bei der Ausführung der Experimente hat sich herausgestellt, dass eine Ermittlung der AB-Schicksale über die Position der apoptotischen Zellen in der Zelllinie nach der neunten Zellteilung wie in Embryonen mit Eischale nicht möglich ist, da die *sud-1* abgeleiteten embryonalen Zellen *in vitro* oft eine kürzere Lebensdauer haben als normale Zellen (Bischoff und Schnabel 2006, Bischoff und Schnabel 2006). Jedoch führten diese Experimente zu einer für diese Arbeit zentralen Beobachtung. Marcus Bischoff, der mir bei diesen schwierigen Experimenten geholfen hat, fiel schnell auf, dass die Zellen beim Entschalen der *sud-1* Embryonen weniger gut aneinander haften als Wildtypblastomeren. Nach dem Entfernen der Eischale als räumliche Begrenzung des Embryos driften die *sud-1* mutanten Blastomere auseinander, wohingegen die Wildtypblastomere stets aneinander haften. Die embryonalen Zellen in *sud-1* Mutanten zeigen eine verminderte Zelladhäsion (Abb. 8). Diese Beobachtung ist der erste Hinweis auf einen zellbiologischen Defekt, einer verringerten Zelladhäsion in *sud-1* Embryonen, der später von zentraler Bedeutung für eine Erklärung der Funktion von *sud-1* sein wird.



**Abb. 8:** Nomarskiaufnahmen der *In-vitro* Kultivierungen von *sud-1* mutanten embryonalen Fragmenten. (A) und (B) Das embryonale Fragment eines Embryos zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt der Kultivierung. (C) und (D) Embryonale Fragmente von zwei weiteren entschalteten Embryonen. Nach einer Mitose driften die beiden neuen Tochterzellen auseinander und sind nur noch über dünne Membranfortsätze miteinander verbunden (Pfeilköpfe).

Im frühen Wildtyp Embryo wird neben den Schicksalsinduktionen in der AB-Zelllinie auch die generelle Polarität des Embryos spezifiziert, die sich unmittelbar in einer Ausrichtung der Zellteilungen manifestiert (Bischoff und Schnabel, 2006). Werden vom Wildtyp (N2) abgeleitete AB-Zellen ohne eine P<sub>2</sub>-Zelle inkubiert, so bilden die Zellen eine birostrale runde Struktur. Werden normale AB-Zellen in Kontakt zu einer normalen P<sub>2</sub>-Zelle inkubiert, so verursacht die P<sub>2</sub>-Zelle eine Streckung des durch die AB-Zellen gebildeten Fragmentes, die als Quotient von Länge durch Breite berechnet werden kann. Verschiedene Kombinationen von AB- und P2-Blastomeren von Wildtyp und *sud-1* Embryonen zeigen zwar eine gewisse Variabilität in der Streckung der Fragmente (Abb. 9), die Werte liegen aber alle in dem von Bischoff und Schnabel für Wildtyp Embryonen gefundenen Bereich: AB[N2]+P<sub>2</sub>[N2] = 3,4; AB[*sud-1*]+ P<sub>2</sub>[N2] = 2,5; AB[N2]+P<sub>2</sub>[*sud-1*] = 2 und AB[*sud-1*]+P<sub>2</sub>[*sud-1*] = 3,2. Dies deutet darauf hin, dass die frühen Zell-Zell Interaktionen wahrscheinlich nicht fundamental in *sud-1* Embryonen gestört sind und damit die Entgleisung der Differenzierung der AB-abgeleiteten Zellen nicht unmittelbar damit erklärt werden kann. Damit ergibt sich die Frage, ob die Schicksale im prämorphogenetischen Stadium (ca. 400 Zellen) eigentlich noch "normal" sind und erst später durch die Abwesenheit der *sud-1* Funktion, die möglicherweise die Zelladhäsion ist, verloren gehen. Oder in anderen Worten, ob eine fehlerhafte Differenzierung die Ursache der exzessiven Proliferation ist oder umgekehrt. Diese Frage, ob der Verlust der Differenzierung auf der exzessiven Proliferation der Blastomere oder doch durch einen primären Verlust der Zellschicksale zurückzuführen ist, soll im Folgenden untersucht werden.



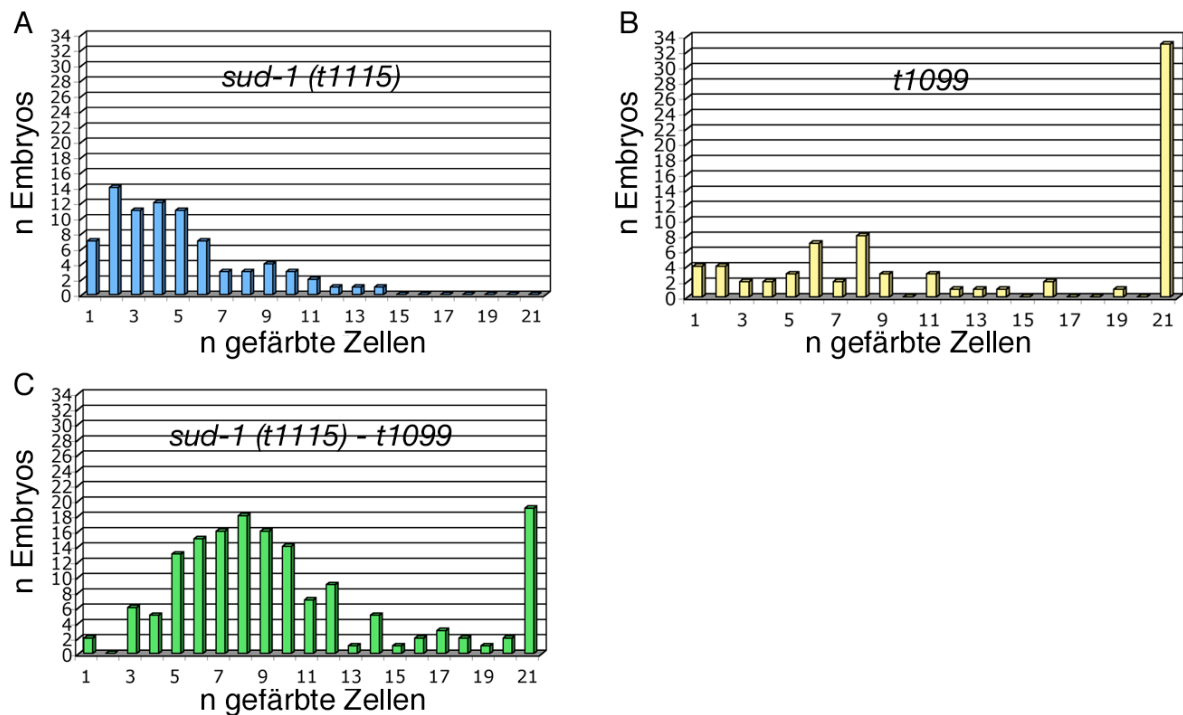
**Abb. 9:** Mosaik-Embryonen aus Wildtyp und *sud-1* mutanten Blastomeren. (A-F) AB-Blastomeren in Kontakt zu einer Wildtyp- $P_2$ -Zelle. (A, D) die Anfangssituation der Kultivierung, (B, E) die Form der terminalen Fragmente (C, F) 3D-Repräsentation der kultivierten Zellen im 64-AB-Stadium. Die Farben symbolisieren Zellen gleicher Vorläufer. (G, H, I) Wildtyp AB-Zellen in Kontakt zu einer *sud-1*  $P_2$ -Zelle.

## Eine Unterdrückung der exzessiven Zellteilungen führt zu einer besseren Differenzierung in *sud-1* Embryonen

Ein ruhender Zellzyklus ist die Voraussetzung für die Differenzierung (Rastinejad *et al.* 1993). Damit sollte eine Unterdrückung der zusätzlichen Zellteilungen, wenn sie die Ursache der fehlenden Differenzierung sind, wieder zu einer besseren Differenzierung der Zellen führen. Sollte die Differenzierung schon früh generell gestört sein, sollte dies entweder keinen Unterschied machen, oder sogar zu einer weiteren Verminderung der differenzierten Zellen führen. Die Frage, ob eine Proliferationsstörung die primäre Ursache ist, kann überprüft werden, indem die zusätzlichen Teilungen der Zellen in *sud-1* unterdrückt werden. Da chemische Zellzyklus-Inhibitoren nicht durch die Eischale des Embryos diffundieren, wurde zu diesem Zweck eine *sud-1* (*t1115*); *t1099* Doppelmutante verwendet. *t1099* ist eine temperatursensitive Mutation, die bei der restriktiven Temperatur von 25°C einen Proliferationsarrest von Embryonen mit 50-100 Zellen verursacht. In dieser Mutante ist bei 25°C die Differenzierung der Zellen im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Das einige Zellen doch die gewebespezifischen Marker exprimieren, ist darauf zurückzuführen, dass früh arreტიerte Zellen zum Teil terminale Differenzierungsmarker exprimieren (Schnabel, H. und Schnabel R. 1990, Cowan und McIntosh 1985). Im eigentlichen Experiment wurden L4-Larven von *t1115*, *t1099* und von der Doppelmutante *t1115*,*t1099* von 15°C auf 25°C umgesetzt und für zehn Stunden bei 25°C inkubiert. Dabei werden die Kul-

turplatten und die Hermaphroditen langsam von 15°C auf 25°C erwärmt, wodurch sich die Auswirkung der Mutation *t1099* von anfänglich gar nicht bis letztlich zur vollen Stärke entfaltet. Die damit verbundene schrittweise Reduktion der Zellzahl in der *t1099* Einzel- und der *t1115,t1099* Doppelmutante und dessen Auswirkung auf die Differenzierung wurde geprüft, indem anschließend die gesamte Brut für eine immunhistochemische Analyse präpariert und mit einem Pharynxmuskel spezifischen Antikörper (3NB12) angefärbt wurde. Die Anzahl der differenzierten Zellen in *sud-1* wird durch den genetischen Hintergrund von *t1099* in diesem Experiment erhöht (Abb. 10). Ein klassischer t-Test mit den erhaltenen Daten zeigt die Signifikanz der Ergebnisse (s. Anhang).

Damit erscheint es wahrscheinlich, dass nicht ein fehlendes Schicksal der Zellen die primäre Ursache für die zusätzliche Proliferation ist, sondern eine zusätzliche Proliferation die Expression der unterliegenden Schicksale verhindert. Damit qualifiziert sich das Gen zumindest formal als rezessives Onkogen.



**Abb. 10:** Terminale Differenzierung mittels Antikörperfärbungen mit 3NB12 gegen Pharynxmuskelzellen, nach dem Temperaturshift von 15°C auf 25°C. (A) *t1115*, (B) *t1099*, (C) *t1115,t1099*. In der Doppelmutante ist im Vergleich zur *sud-1* Mutante die Anzahl der Pharynxmuskelzellen deutlich erhöht. Bei der Mutante *t1099* wurden sehr viele Embryonen gefunden, die wie der Wildtyp voll ausdifferenziert waren und in denen 21 Pharynxmuskelzellen gefärbt waren. Eigentlich dürften diese Embryonen bei der Auswertung des Experimentes nicht beachtet werden, denn in *sud-1* sollten eigentlich kaum Darmzellen gefärbt werden. Die Ursache für diese Darmzell-Färbung ist nicht bekannt. Der t-Test wurde aus diesem Grund einmal mit den ausdifferenzierten Embryonen durchgeführt, und einmal ohne diese, und in beiden Fällen war das Ergebnis signifikant.



**Tab. 4:** Statistische Werte der jeweils mit 3NB12 gefärbten Zellen.  
In Klammern die Werte ohne Berücksichtigung der Embryonen, die 21 Zellen färben.

	<i>t1115</i>	<i>t1099</i>	<i>t1115, t1099</i>
Mittelwert	4,81	13,03 (7,07)	10,16
Standardabweichung	3,06	7,65 (4,30)	5,37
Anzahl d. Stichproben	80,00	77,00 (44,00)	157
Varianz	9,27	57,88 (18,11)	28,75
t-Wert <i>t1115</i> <-> <i>t1099</i>	8,77	(3,07)	p < 0,001
t-Wert <i>t1099</i> <-> Doppelmutante	2,96	(3,97)	p < 0,001
t-Wert <i>t1115</i> <-> Doppelmutante	9,73	(9,73)	p < 0,001

Eine wichtige Erkenntnis, die aus diesem Experiment gewonnen wurde ist, dass die Zellen noch die Fähigkeit zur Differenzierung und somit ein Schicksal haben. Die am Anfang dieser Arbeit gezeigten Analysen der Zellbewegungen zeigte, dass die Zellen noch die Fähigkeit haben, sich "normal" zu bewegen, jedoch nicht die für ihre genealogische Herkunft typischen Positionen einnehmen. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, ob die primäre Ursache dafür der Verlust ihrer Schicksalsidentität ist, oder eine mangelnde Zielführung der Zellen. Die eben gefundenen Resultate sprechen dafür, allerdings ohne sehr stringent zu sein, dass unter anderem auch die Zielführung der Zellen gestört sein könnte. Da diese Frage sehr wichtig für eine angemessene Würdigung des Phänotyps und damit die Funktion des *sud-1* Gens ist, habe ich versucht, mit neuesten Methoden des Labors Schnabel diese Frage nochmals zu adressieren.

### Sind die AB-Schicksale in *sud-1* korrekt?

In dem zuvor beschriebenen Experiment wurde deutlich, dass die Zellen noch differenzieren können, die Frage nach der Herkunft der differenzierenden Zellen ist jedoch noch unklar. Wie schon beschrieben sind die Zelllinien in den *sud-1* Embryonen so abnormal, dass die Erkennung der AB-Schicksale durch die Interpretation der Position apoptotischer Zellen innerhalb eines Embryos nicht möglich ist. Ebenso schwierig ist die Herleitung der Schicksale aus der terminalen Position der Zellen, da die Zellen anscheinend ziellos migrieren. Die Frage ist, ob diese anscheinend ziellosen Migrationen nicht doch durch eine neue Schicksalsverteilung in den AB-Nachkommen zu erklären ist, da ja Schnabel et al 2006 gezeigt haben, dass eine Manipulation der Zellschicksale im 12-Zell-Stadium zu neuen regionalen Migrationsmustern führen.

Dazu wurden zwei Ansätze gewählt. Im Ersten wurde, um die Komplexität der zu erwartenden Muster zu verringern, mit einer zweiten Mutation (*glp-1*, *e2144ts*) die Zahl der möglichen AB-Schicksale eingeschränkt. Das Gen *glp-1* liegt auf Chromosom III und kodiert für einen Notch-Rezeptor in *C. elegans*. In *glp-1* mutanten Emb-

ryonen findet ausschließlich die erste Induktion während der frühen Embryogenese statt, weswegen sich nur die beiden AB-Schicksale ABala und ABarp ausbilden (Abb. 1 und Hutter *et al.* 1994) und alle posterioren Zellen mit nun anteriorem Schicksal nach anterior wandern (Abb. 11). Marcus Bischoff konnte bei einer anderen Mutante im Gen *gpb-1* zeigen, dass der genetische Hintergrund einer Mutation in *glp-1* sehr gut für die Interpretation von aberranten Zellmigrationen geeignet ist. Eine Mutation in dem Gen *gpb-1* führt dazu, dass sich die Zellen im *C. elegans* Embryo nicht mehr wie im Wildtyp sortieren. Man konnte die fehlerhafte Anordnung der Zellen entweder dahingehend interpretieren, dass die Zellmigrationen nicht mehr richtig funktionieren, oder aber dass diese doch normal verlaufen, aufgrund der drastischen Defekte in den frühen Zellteilungsrichtungen des Embryos die Zellen es wegen der vielen durchmischten Zellidentitäten jedoch nicht mehr schaffen, das normale Muster herzustellen. Marcus hatte vorhergesagt, dass eine starke Reduzierung der möglichen Zellschicksale durch die *glp-1* Mutante die Qualität der Zellsortierungen wieder stark erhöhen sollte. Dies war dann auch offensichtlich der Fall.

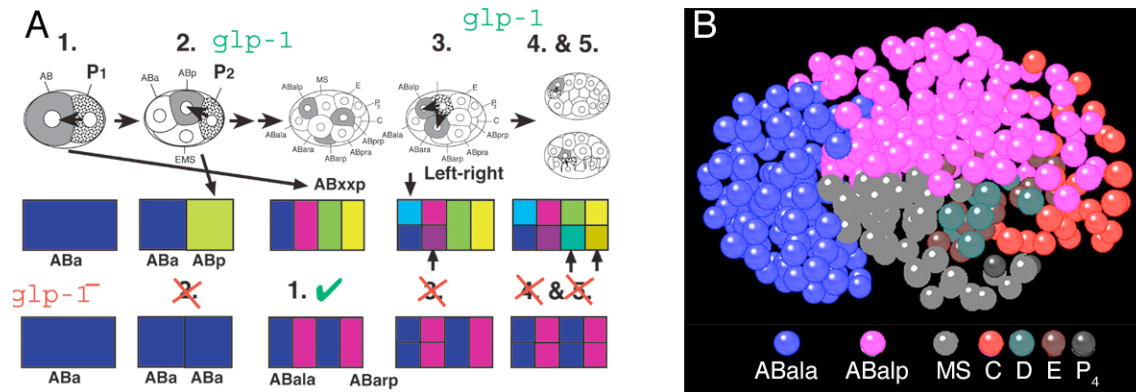
Für die hier verwendeten *sud-1;glp-1* Doppelmutante könnten bezüglich der AB-Schicksale unter den möglichen Phänotypen zwei zu einer klaren Aussage führen.

- Die Doppelmutante weist im frühen Embryo die AB-Schicksale ABala und ABarp auf. Selbst wenn Teile der Induktionen gestört sein sollten, könnte eigentlich nur noch als Ausfallschicksal eine Vermehrung des ABala-Schicksals auftreten (Hutter *et al.* 1994). In jedem Fall müssten dann posterior ABala-Schicksale auftreten, die wie in der *glp-1* Mutante selbst zu starken Zellbewegungen zumindest einzelner Zellen nach anterior führen sollten. Sollten diese beobachtet werden, würde das dafür sprechen, dass erstens die noch potentiell anwesenden Zellschicksale intakt wären und dass zweitens der Migrationsdefekt in *sud-1* Mutanten sekundär auf eine zu komplexe Aberration der Zellschicksale zurückzuführen wäre.

- Die Doppelmutante hat den gleichen Phänotyp wie die Mutation von *sud-1* allein. In dem Fall könnte man keine neuen Erkenntnisse aus der Doppelmutante gewinnen.

Die globalen Werte der Doppelmutante wie Migrationsstrecken, Luftlinien-Distanzen und Mitosedistanzen sind mit denen in *sud-1* Embryonen identisch. Es sind keine spezifischen Bewegungen von Zellen nach anterior zu erkennen (Abb. 12). Die globale Anordnung der Zellen, wie sie durch die RMS-Werte bestimmt werden kann, ist in allen betrachteten Embryonen sehr unterschiedlich (Tab. 5). Insofern unterscheidet sich der Phänotyp nicht von *sud-1* selbst. Auch eine 4D-Analyse der AB-Zelllinien in der Doppelmutante zeigt bezüglich der AB-Schicksale keine Unterschiede zur *sud-1* Mutante (Tab. 7).

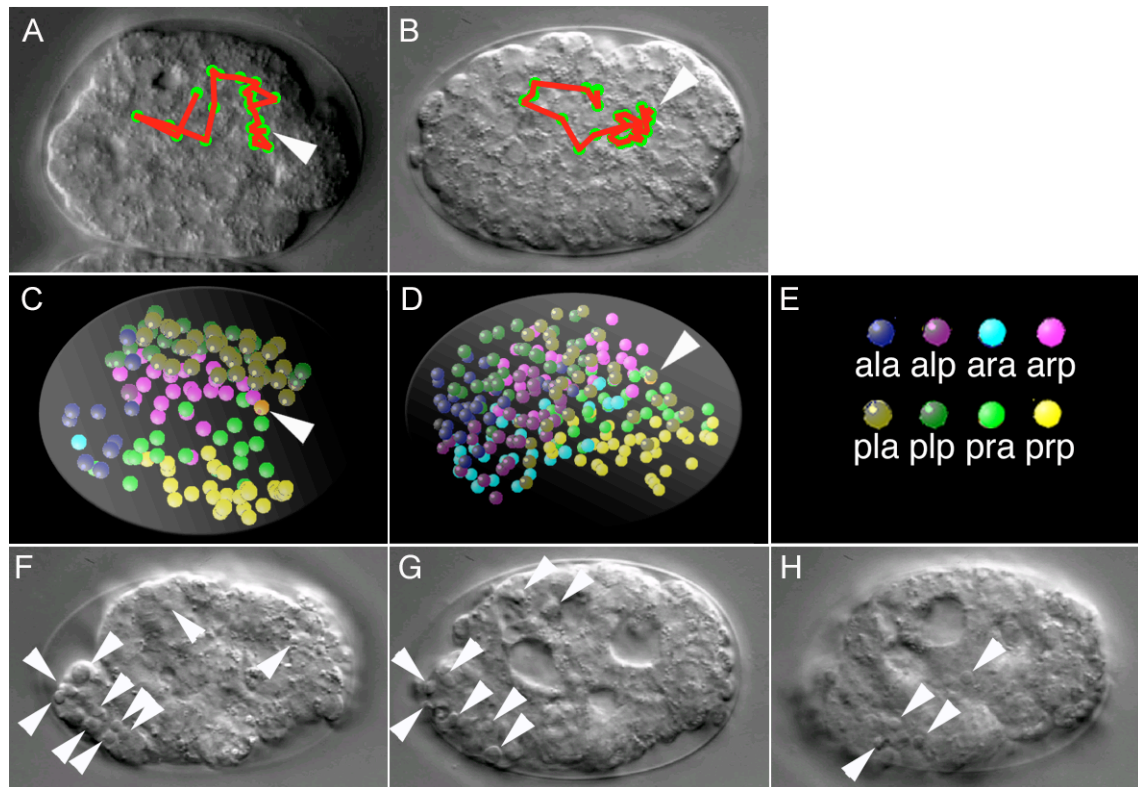




**Abb. 11:** Die 5 frühen Induktionen der *C. elegans* Embryogenese in der *glp-1* Mutante. (A) Die erste Induktion, ausgehend von der P1-Zelle, polarisiert die sie berührende AB-Zelle in eine anteriore und eine posteriore Hälfte, welche sich zwei Teilungen später in der posterioren Identität der AB-Nachkommen äußert. Die 2., 3., 4., und 5. Induktion sind *glp-1*-abhängig und fallen in der *glp-1* Mutante aus, wodurch nur die beiden Schicksale ABala und ABarp entstehen. (B) 3D-Repräsentation eines in *glp-1* mutierten Embryos. Anterior links, posterior rechts. Der Farbcode symbolisiert die Abstammung der Blastomeren von den jeweiligen Vorläuferzellen. Die nicht induzierten Zellen migrieren aufgrund ihrer neuen Identität vom posterioren Teil des Embryos zum anterioren Ende.

**Tab. 5:** Vergleich der Migrationswege embryonaler Zellen im Wildtyp, in *sud-1* Mutanten und in der *sud-1;glp-1* Doppelmutante (*t1242-e2144b*). Die Einheit ist Eilänge.

Embryo	Σ Migrationen	Σ Luftlinien	Σ Mitosedistanzen	RMS vs. Wildtyp #5	RMS vs. <i>glp-1</i>	RMS vs. <i>sud-1</i> #1	RMS vs. <i>sud-1</i> #2
Wildtyp #1	170	56	27	0,05	0,224	0,187	0,207
Wildtyp #2	143	50	26	0,06	0,224	0,185	0,203
Wildtyp #5	168	45	27	0	0,227	0,191	0,213
<i>sud-1</i> #1	174	40	22	0,191	0,216	0	0,210
<i>sud-1</i> #2	175	62	25	0,213	0,209	0,210	0
<i>sud-1;glp-1</i>	174	44	25	0,188	0,213	0,158	0,221
<i>glp-1</i>	128	46	26	0,227	0	0,216	0,209



**Abb. 12:** Der Phänotyp der *sud-1(t1242);glp-1(e2144ts)* Doppelmutante. (A) und (B) Normalskizzen zwei verschiedener Embryonen der Doppelmutante von homozygot mutierten Hermaphroditen bei 25°C nach der neunten Teilungsrunde. Anterior jeweils links und posterior jeweils rechts. Die Migrationsstrecke der am weitesten posterior gelegenen Zellen aus der Zelllinie ABarp (rosa) ist als rot-grüne Linie mit der Software SIMI®BioCell markiert. (C) und (D) 3D-Repräsentation der Zellen in (A) und (B). (E) Farbcode der 3D-Repräsentationen. (F) bis (H) Phänotyp von Embryo (A) kurz vor Ende der Entwicklung in oberer, mittlerer und unterer Fokusebene. Das Embryo hat überzählige, nicht aufgenommene apoptotische Zellkörper (Pfeilköpfe). Die Zellen migrieren wie in *sud-1* ziellos und die Nachkommen der jeweiligen Vorläuferzellen sortieren nicht nach anterior oder posterior wie in der *glp-1* Mutante.



Da es sich hier um ein negatives Ergebnis handelt, ist dieses schwer zu interpretieren. Jedoch, wie schon ausführlich diskutiert, gibt die terminale Auswertung der Zellschicksale keine Information über die Schicksale, bevor der "onkogene" Phänotyp zum Ausdruck kommt. Positiv betrachtet hat dieses Experiment zumindest die Hypothese, dass *SUD-1* zur Führung der Zellbewegungen gebraucht wird, nicht falsifiziert.

Eine letzte mir noch relevant erscheinende Frage bezüglich des Problems der Kopplung von Zellschicksal und Migration ist, ob die Zellbewegungen und terminalen Positionen der Zellen sich zwar sehr komplex geändert haben, aber trotzdem noch in einem sinnvollen Zusammenhang stehen, der mit dem "bloßen" Auge nicht zu erkennen ist.

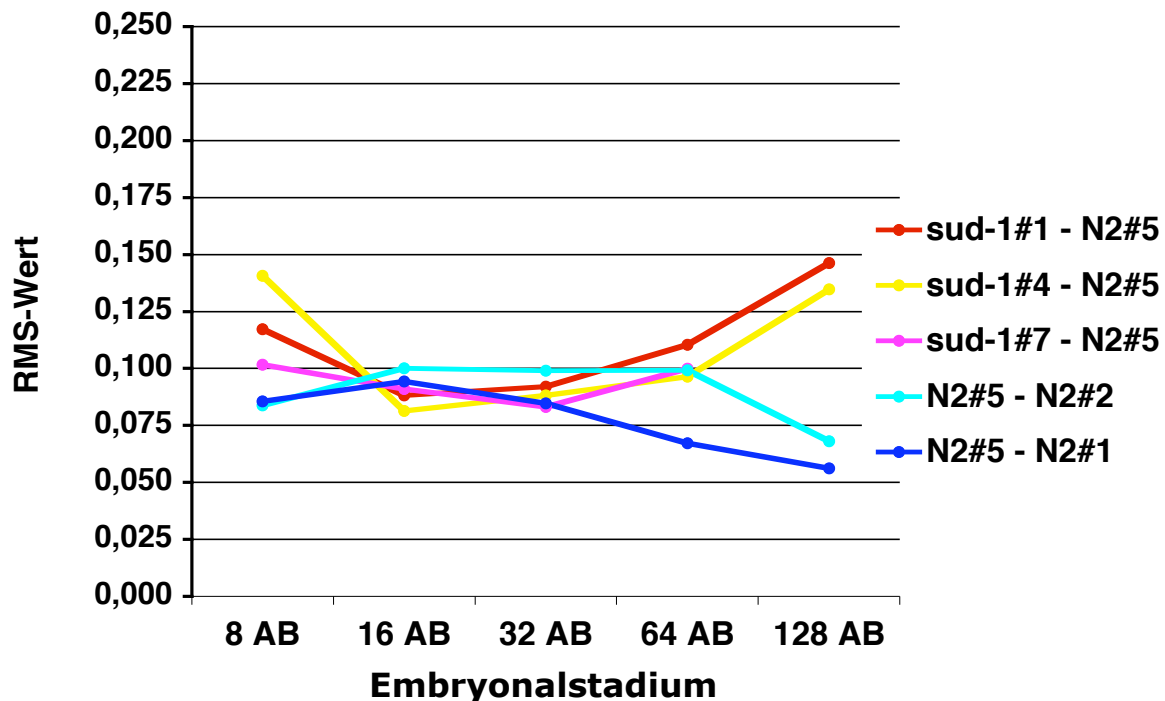
Arend Hintze hat ein Programm <predictor> erstellt (Hintze 2006, Dissertation) das mit Hilfe der aus der normalen Entwicklung bekannten Zelldistanzen testen kann, ob die Nachkommen der 8 AB-Blastomeren im 12-Zell-Stadium in ihrer Anordnung einer der typischen AB-Regionen in irgendeiner Wiese ähneln. Dieses Programm ist zum Beispiel in der Lage, die Schicksalsverteilung der Blastomeren in einer *glp-1*-Mutante mit 90 %iger Sicherheit zu identifizieren. Dabei werden alle 8<sup>8</sup> möglichen Schicksalskombinationen berücksichtigt. Ich habe zwei *sud-1* Embryonen mit diesem Programm analysiert und zur Sicherheit die Vorhersagen gegen völlig randomisierte Embryonen abgeglichen. Die Ergebnisse geben keinen Hinweis auf mögliche diskrete Schicksalstransformationen in der AB-Zelllinie (Tab. 6).

**Tab. 6:** Die wahrscheinlichsten Zellschicksale der AB-Zelllinien in *sud-1* nach den Berechnungen von predictor.

Name der AB-Zelllinie in SIMI® BioCell	<i>sud-1A</i>				<i>sud-1B</i>			
	AB-Schicksal im Vergleich mit Wildtyp E5 (Vergleichswert)		AB-Schicksal im Vergleich mit E5_random (Vergleichswert)		AB-Schicksal im Vergleich mit Wildtyp E5 (Vergleichswert)		AB-Schicksal im Vergleich mit E5_random (Vergleichswert)	
ABala	ala	83,20	ara	85	ala	89,64	ara	91
ABalp	ara	84,96	ara	91	ara	89,25	ara	73
ABara	ala	86,32	alp	95	ala	94,72	ara	70
ABarp	alp	94,53	alp	97	alp	76,74	alp	100
ABpla	prp	87,30	ara	91	prp	84,57	alp	57
ABplp	prp	93,16	plp	56	ala	86,71	pla	68
ABpra	ala	82,03	plp	61	ala	86,71	ara	91
ABprp	arp	63,86	plp	68	ara	71,67	alp	79

Die neuen Verteilungsmuster der von den acht AB-Gründerzellen abgeleiteten Regionen sind also nicht durch neue Schicksale der Zellen zu erklären, was wie schon oft diskutiert, die Ursache haben kann, dass die Zellen kein definiertes Schicksal mehr haben, und deshalb nicht migrieren, oder das nur die schicksalsabhängige Zellführung, auf der ja diese Methode basiert, nicht funktioniert. In diesem Zusam-

menhang ist es noch interessant zu bestimmen, wann während der Embryogenese von *sud-1* Embryonen die Position von Zellen anfängt, von normalen Positionen abzuweichen. In normalen Embryonen beginnen sich die Zellen nach dem 32-AB-Zellstadium signifikant in dem Zellfokussierungsprozess (s. Einleitung) zu bewegen. Die entsprechende bioinformatische Analyse (Abb. 13) zeigt, dass die Zellanordnung ab dem 32 Stadium in *sud-1* Embryonen beginnt, von der in Wildtyp Embryonen abzuweichen. Sobald die Zellen normalerweise anfangen sich signifikant zu bewegen, nehmen sie in *sud-1* Embryonen falsche Positionen ein.



**Abb. 13:** Die RMS-Werte bei dem Vergleich von *sud-1* und Wildtyp Embryonen über den Verlauf der Embryogenese. Im Wildtyp fangen die Zellen ab dem 32-AB-Stadium mit signifikanten Migrationen an, um die anfängliche Unterschiedlichkeit (RMS = 0,08 – 0,1) auszugleichen, und um bis zum Ende der Entwicklung die hohe Ähnlichkeit der prämorphogenetischen Stadien zu erreichen. Der Vergleich von *sud-1* Mutanten mit Wildtyp Embryonen zeigt, dass die *sud-1* Embryonen ab dem 32-Zell-Stadium noch unähnlicher zum Wildtyp werden, wodurch deutlich wird, dass die Migrationen in *sud-1* nicht zum normalen prämorphogenetischen Stadium führen.

Nach den bisherigen Experimenten kann der *sud-1* Phänotyp wie folgt zusammengefasst werden:

*sud-1* Embryonen zeigen eine exzessive Zellproliferation. Schon bevor diese eintritt, sind alle Zellen im 400-Zell-Stadium falsch positioniert. Durch die normale Kopplung von Zellschicksal und Zellposition bleibt unklar, in welchem Prozess der primäre Defekt liegt. Wird die zusätzliche Proliferation experimentell unterdrückt, findet wieder eine erhöhte Differenzierung der Zellen statt. Dies ist ein Indiz dafür, dass die aberrante Zellproliferation unterliegende Schicksale der Zellen supprimiert. Es ist

damit nicht ausgeschlossen, dass die Führung der Zellbewegungen nicht funktioniert, die Frage bleibt offen.

*sud-1* Embryonen haben einen Zelladhäsionsdefekt. Die beobachtete gestörte Phagozytose der Zelltode ist möglicherweise auf eine mangelnde Zelladhäsion zurückzuführen. Es ist eine interessante Frage, ob die pleiotropischen Defekte der *sud-1* Embryonen alleine durch ein mangelnde Zelladhäsion zu erklären sind.

Um Hinweise auf die molekulare Funktion von SUD-1 zu erhalten, dessen Sequenz keinerlei Hinweise auf eine Funktion ergab, ist es notwendig das Protein zellbiologisch zu charakterisieren.

## **Zellbiologische Charakterisierung von SUD-1**

Um die subzelluläre Lokalisation des SUD-1 Proteins im Embryo zu finden, wurde in Vorarbeiten bereits versucht, die Mutante mit einem funktionellen genomischen *sud-1-gfp*-Fusionskonstrukt zu komplementieren. Nach erfolgreicher Transformation von *sud-1* heterozygot mutierten Hermaphroditen konnte gezeigt werden, dass dieses Fusionskonstrukt die homozygoten Nachkommen komplementieren kann, aber eine Expression des GFP konnte nicht detektiert werden (Müller 2003, Diplomarbeit). Es könnte sein, dass das SUD-1-GFP-Fusionsprotein für die Sensitivität des Fluoreszenzmikroskops zu schwach exprimiert wird oder dass die Transformationsmethode an sich ein Problem darstellt. Die Transformanten integrieren die Fremd-DNA nicht immer direkt in ihr Genom, sondern bilden meist so genannte extrachromosomale Arrays, in denen mehrere hundert Kopien oder Fragmente des Fusionskonstruktes und des Expressionsvektors in den Zellen als Konkatenomere miteinander verknüpft sind. Die dadurch erhöhte Gendosis des transformierten Gens ist für die Transformanten meist letal, weshalb die Arrays sehr schnell, innerhalb von ein bis zwei Generationen, bis auf die zum Überleben nötige Mindestmenge abgebaut oder nicht exprimiert werden. Wahrscheinlich ist dies bei dem *sud-1-gfp*-Fusionskonstrukt der Fall, und die subzelluläre Lokalisation kann auf diese Art nicht sichtbar gemacht werden.

Die Letalität der extrachromosomalen Arrays kann verringert werden, indem die Fremd-DNA nicht in Form von aufgereinigten konzentrierten Plasmiden, sondern mit einem komplexen Hintergrund genomischer DNA transformiert wird. In diesem Zusammenhang wurde von H. Schmidt die Methode der YAC-Rekombination (s. Material und Methoden) zur Herstellung von genomischen Fusionskonstrukten etabliert. Die Letalität der Überexpression von transformierten Genen konnte mit dieser neuen Methode zwar reduziert werden, was an einer deutlich höheren Transformationsrate erkennbar ist, die Expression eines auf diese Weise hergestellten *sud-1-gfp*-Fusionskonstruktes konnte aber auch nicht detektiert werden. Daher wurde von einem *sud-1-gfp*-Fusionskonstrukt abgesehen, und zur Lokalisation von SUD-1 in der Zelle im Hause monoklonale murine Antikörper selbst hergestellt.

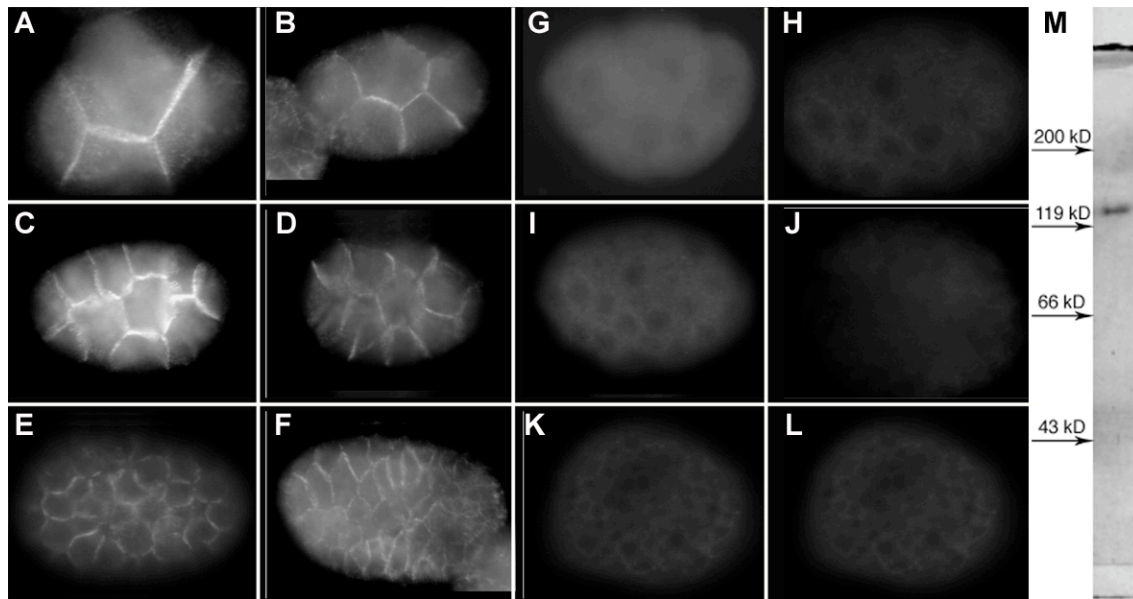
## **Das SUD–1 Protein ist an der Membran lokalisiert**

### **Herstellung eines monoklonalen SUD–1 Antikörpers**

Für die Herstellung monoklonaler muriner Antikörper wird das entsprechende Antigen in möglichst reiner Form und in ausreichenden Mengen zum Immunisieren der Mäuse benötigt. Ich habe mich zur Produktion des Antigens durch die Überexpression des SUD–1 Proteins in *E. coli* entschieden, da dies die einfachste Methode zu sein schien. Ich musste eine große Zahl unterschiedlicher Expressionssysteme und verschiedene Fragmente der *sud–1*-cDNA testen, um die nötige Menge Antigen zu erhalten. Am besten funktionierte die Expression eines 25 kDa großen Peptids [SUD–1(AS 233-486)] und dem kompletten SUD–1 Protein, jeweils subkloniert in den Expressionsvektor pASK-IBA43+ (s. Material und Methoden).

Mit dem kompletten SUD–1 Protein wurde in Zusammenarbeit mit Sabine Buchmeier erfolgreich ein monoklonaler Antikörper (5B9) hergestellt. Der Antikörper ist hoch spezifisch, da er in einer Western Blot-Analyse mit Wildtyp Proteinextrakt von N2 Bristol nur ein Protein von ca. 130 kDa erkennt, was der Größe des vorhergesagten SUD–1 Proteins entspricht. Dieser Antikörper färbt die Membranen von Wildtyp Embryonen zwischen dem 2-Zell- und dem prämorphogenetischen Stadium (Abb. 14). Die Intensität der Immunofluoreszenz nimmt dabei stetig ab. Genetisch wirkt das Gen rein maternal, sodass es möglich ist, dass keine signifikante Neusynthese mehr stattfindet. Mutante *sud–1* Embryonen (*t1237*) zeigen keine Färbung, was auch für die Spezifität des Antikörpers spricht. Die Lokalisierung des Proteins ist mit der Hypothese, dass es sich um ein Zelladhäsion vermittelndes Protein handelt im Einklang. Später wird noch die Frage bearbeitet, mit welchen anderen Molekülen SUD–1 interagiert. Einer der Ansätze in diese Richtung war es, mit der TAP-tag-Technologie nach Interaktionspartnern zu suchen. Zunächst wird aber nur gezeigt, dass ein SUD–1-TAP-tag-Konstrukt ebenfalls auf der Membran lokalisiert, was als weiterer Hinweis für eine Membranassoziiierung des SUD–1 Proteins gesehen werden kann.



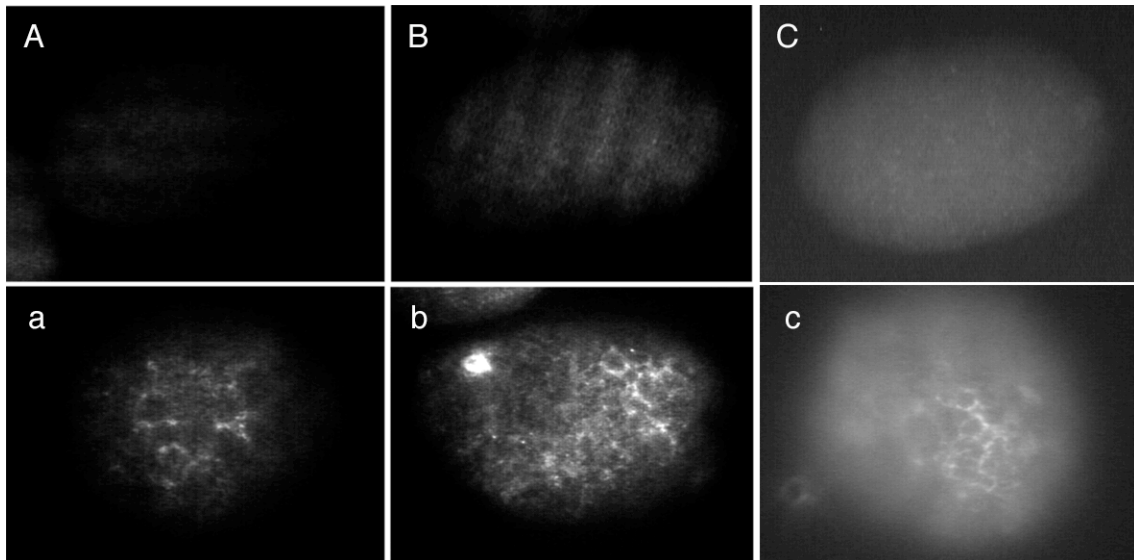


**Abb. 14:** Antikörperfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper 5B9 und PFA fixierten Embryonen, Western Blot mit 5B9 gegen *C. elegans* Wildtyp Eiextrakt. (A) bis (D) frühe Wildtyp-embryonen, (E) und (F) späte Wildtypembryonen, (G) bis (L) Embryonen von Hermaphroditen homozygot für das *sud-1* Allel 1237. Der primäre Antikörper (5B9) wurde 1 : 5 und der sekundäre Antikörper (Alexa 568 $\alpha$ IgM) wurde 1 : 200 in TBST verdünnt. (M) Für den Western Blot gegen *C. elegans*-Proteinextrakt wurde der Antikörper 1 : 5 in PBS verdünnt, und das SUD-1 Protein wurde in dem *C. elegans*-Wildtyp-Eiextrakt mit PBS + 10% Triton + 10% Glycerin aus den Membranen gelöst. Der Antikörper färbt im Wildtyp die Zellmembran, jedoch nicht in der Mutante. Im Western Blot erkennt der Antikörper nur SUD-1.

### SUD-1 Lokalisation mittels eines TAP-tag-Konstruktes

Es wurde ein SUD-1-cTAP-Fusionsprotein konstruiert, um eine TAP-tag-Aufreinigung des SUD-1 Proteins durchzuführen. In Embryonen transgener TAP-tag Hermaphroditen wurden mit einem murinen Antikörper, der spezifisch gegen das TAP-tag gerichtet ist, ebenfalls Immunfluoreszenzen durchgeführt. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, ist dieses Konstrukt auf der Membran lokalisiert, was eine weitere unabhängige Evidenz für eine Membranlokalisierung des Proteins ist. Die weiteren TAP-tag Experimenten werden später beschrieben.





**Abb. 15:** Antikörperfärbungen zur Lokalisierung des SUD-1-cTAP-Fusionsproteins. (A) bis (C) Wildtypkontrolle, (a) bis (c) SUD-1-cTAP exprimierende Linie. Verdünnungen des primären murinen Antikörpers gegen TAP-tag: (A,B,a,b) 1 : 400 in TBST, (C,c) 1 : 100 in TBST. Sekundärer Antikörper: Ziege gegen Maus, polyklonal, Cyber 3 gekoppelt., 1 : 250 in TBST. Der Antikörper erkennt das rekombinante SUD-1-cTAP Fusionsprotein an der Zelloberfläche in Embryonen der cTAP-Linie, jedoch nicht in Wildtyp Embryonen.

## Was ist die molekulare Funktion von SUD-1

Die immunohistologischen Daten machen es wahrscheinlich, dass es sich bei SUD-1 um ein Zelladhäsionsmolekül handelt, da ja in den *in vitro*-Rekombinationsexperimenten von Blastomeren die Zelladhäsion eindeutig vermindert war. Allerdings gibt es keinen Hinweis darauf, in welchem der Zelladhäsionssysteme das Molekül funktioniert, da es keine molekulare Homologie gibt. Um diese Frage zu lösen wurden zwei Strategien verfolgt. Die erste, ein Yeast-Two-Hybrid-Ansatz, soll nun vorgestellt werden. Die zweite Strategie, die TAP-tag-Technologie bzw. Pull-down-Experimente, werden im Anschluss daran beschrieben.

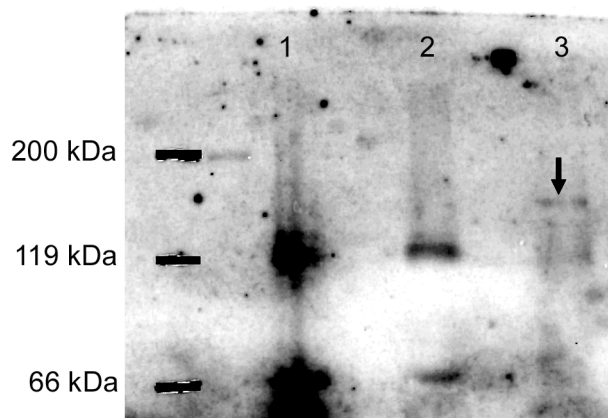
## Die Suche nach Interaktionspartnern von SUD-1: ein Yeast-Two-Hybrid

Um das Protein eventuell über die Identifizierung eines bestimmten Interaktionspartners (Phizicky *et al.* 1995) einem Signalweg zuzuordnen, wurden parallel zu der schon beschriebenen Herstellung eines monoklonalen Antikörpers Yeast-Two-Hybrid-Experimente durchgeführt.

Das Y2H-System (Y2H) nutzt den Transkriptionsfaktor GAL4 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. GAL4 reguliert in der Hefe die Expression des Galactose Stoffwechsel Proteins  $\beta$ -Galactosidase und besteht aus zwei Domänen: einer DNA bindenden Domäne (DNA-BD), welche spezifisch an die <upstream activating sequence> in dem Promotor des  $\beta$ -Galactosidase-Gens bindet und einer transkription-

saktivierenden Domäne (AD). Bei einem Y2H werden beliebige Proteine (protein of interest, POI) in einem Hefe-Expressionsvektor als Fusionsprotein mit der DNA-BD kodiert. Eine cDNA Bank, die als Quelle der Proteine aus dem relevanten Organismus dient, wird in einen anderen Hefe-Expressionsvektor subkloniert, wodurch ein Gemisch aus vielen unterschiedlichen Expressionsvektoren entsteht, welche einzelne oder mehrere zufällig in den Vektor ligierten cDNA-Fragmente enthalten, die alle mit der Sequenz der AD fusioniert sind. Hefezellen, welche durch Mutation die endogene GAL4-Aktivität verloren haben, werden nacheinander mit dem POI-DNA-BD kodierenden Vektoren und dem Gemisch der cDNA-AD kodierenden Vektoren transformiert. Wenn ein in der cDNA Bank codiertes Protein mit dem POI interagiert, kommen die aktivierende Domäne und die DNA bindende Domäne in räumliche Nähe, und ein Reporter gen unter der Kontrolle des  $\beta$ -Galactosidase-Promoters kann exprimiert werden.

Vor der Durchführung des eigentlichen Y2H-Screens wurde die Expression des Fusionsproteins SUD-1fl-BD im Western Blot nachgewiesen (Abb. 16).



**Abb. 16:** Western Blot zum Nachweis der Expression von cMyc-getaggttem SUD-1cDNAfl in dem Hefestamm AH109. (1) bis (3) Primärer Antikörper anti cMyc, sekundärer Antikörper gegen Maus. Proteinextrakte aus: (1) = positiv Kontrolle, (2) = AH109 ohne pGBKT7/cDNAfl, (3) = AH109 transformiert mit pGBKT7/cDNAfl. Die Bande von SUD-1fl-BD ist bei ca. 130 kDa deutlich sichtbar (Pfeil).

Eine statistische Übersicht über die Transformationsraten ist in Tabelle 7 gezeigt. Die Anzahl der gefunden möglichen Interaktionspartner konnte durch die unterschiedlichen Kultivierungsmedien und Retransformationen reduziert werden.

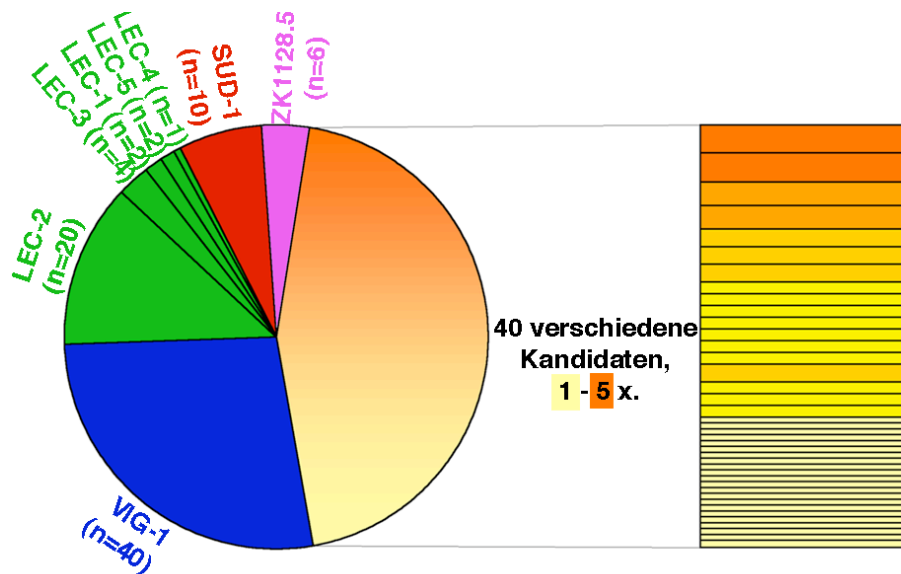
**Tab. 7:** Statistik der Hefetransformationen für den Y2H-Screen.

screen	Transformations-rate	getestete Klone	positive 1. Runde His <sup>-</sup>	positive 1. Runde His <sup>-</sup> , Ade <sup>-</sup>	Transformanden in <i>E.coli</i>	positive 2. Runde His <sup>-</sup> , Ade <sup>-</sup>
1	$2.81 \times 10^5$	$2.81 \times 10^4$	40	25	25	12
2	$3.85 \times 10^5$	$3.85 \times 10^4$	71	29	15	11
3	$2,39 \times 10^5$	$2,39 \times 10^4$	25	10	9	9
4	$8,40 \times 10^5$	$8,40 \times 10^4$	138	40	38	19
5	$2.05 \times 10^6$	$2.05 \times 10^5$	140	62	62	56
6	$4.22 \times 10^6$	$4.22 \times 10^5$	250	112	107	54
Summe	$8,01 \times 10^6$	$8,01 \times 10^5$	664	278	256	161

Eine detaillierte Aufstellung aller im Y2H gefundenen Interaktionspartner enthält die Tabelle T9 im Anhang. Es wurden 161 Interaktionen gefunden, die auf 48 verschiedenen Genen basieren. In Y2H-Experimenten treten neben hoch spezifischen Interaktionen typischerweise artifizielle Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und ribosomalen Proteinen auf oder mit solchen, die eine Funktion im RNA-Metabolismus ausüben. Diese Proteine haben von sich aus meist eine starke Affinität zur DNA haben und bewirken so die Transkription des Reportergens.

Um die Interaktionskandidaten möglichst schnell zu charakterisieren und zu sortieren, muss der Phänotyp der entsprechenden Gene bestimmt werden. Eine einfache und schnelle Möglichkeit, die Expression eines bestimmten Proteins in *C. elegans* zu unterdrücken, stellt die RNA-Interferenz (RNAi) dar (Hannon 2002). Es gibt starke Hinweise, dass die Methode nicht immer zuverlässig funktioniert. Deshalb ist es schwierig, aus einem RNA-Interferenz Experiment Schlüsse zu ziehen, wenn sich kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp ergibt.

Eine große Anzahl von Kandidaten wurde in dem Y2H nur einmal gefunden und wenige andere Proteine (VIG-1, Galectine, ZK1128.5 und SUD-1) haben häufig mit SUD-1 interagiert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Die am häufigsten im Y2H gefundenen Kandidaten.

Um zu prüfen, welche Kandidaten wahrscheinlich *in vivo* Interaktionspartner von SUD-1 sind, wurden mit den am häufigsten vorkommenden Kandidaten RNAi-Experimente durchgeführt. Es ist durchaus möglich, dass sich unter den nur einmal aufgetretenen Genen noch Interaktionspartner von SUD-1 befinden, dies wurde jedoch nicht weiter untersucht. Bezüglich der Interaktionspartner von SUD-1 ist zu erwarten, dass eine Verhinderung der Expression einen ähnlichen oder den gleichen Phänotyp hervorruft wie eine Mutation von *sud-1* selbst. Oder die Interaktionspartner könnten, falls sie das SUD-1 Protein inhibieren, den entgegengesetzten Phänotyp bewirken.

Am häufigsten ist das Protein VIG-1 in dem Yeast-Two-Hybrid aufgetreten (n=40). VIG-1 steht für <Drosophila Vasa Intronic Gene>. Das VIG-1 in *C. elegans* ist ein Ortholog zu dem VIG-1 aus Drosophila, welches als ein Schlüsselprotein im RNAi-Mechanismus identifiziert wurde (Buckingham *et al.* 2004). Bisher gibt es keinerlei Hinweise darauf, weder durch Sequenzanalysen noch aufgrund der Phänotypen der *sud-1* Mutanten, dass *sud-1* eine Funktion im RNAi-Mechanismus hat. Zudem zeigen die monoklonalen Antikörper eindeutig eine Lokalisation an der Zellmembran. Die Interaktion von SUD-1 mit VIG-1 macht also nach allen bisherigen Erkenntnissen keinen Sinn, weswegen VIG-1 als ein falsch positiver Interaktionsklon eingestuft wurde. Da VIG-1 aber so überdurchschnittlich oft in dem Y2H aufgetreten ist, habe ich in RNAi-Experimenten untersucht, ob die transiente Unterdrückung der VIG-1 Expression einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung von *C. elegans* hat. Durch die RNA-Interferenz gegen VIG-1 ist kein Defekt in der Entwicklung von Wildtypembryonen aufgetreten (Tab. 8).

Als insgesamt zweithäufigste Kandidaten wurden Galectine gefunden: *lec-2* (n = 20), *lec-3* (n = 4), *lec-1* (n = 2), *lec-5* (n = 2) und *lec-4* (n = 1). Galectine sind Zucker bindende Proteine mit einer für  $\beta$ -Galactose spezifischen Karbohydrat-Bindedomäne. Aus *in vitro*-Experimenten mit humanen oder murinen Carcinomzelllinien ist bekannt, dass die Galectine wichtige Funktionen in der Migration von Zellen (Perillo *et al.* 1998) sowie bei der Regulation von Apoptose und Zellteilung haben. Da dies auch in *sud-1* Embryonen gestörte Prozesse sind, scheinen die Galectine sehr interessante Interaktionskandidaten zu sein. Die RNA-Interferenz des Galectins *lec-2* allein hatte keine Auswirkung auf die Embryogenese von *C. elegans*. Die Interferenz von mehreren Galectinen gleichzeitig bzw. anderer Galectine einzeln führte jedoch zu einem embryonalen Arrest der Zellproliferation mit ca. 50-100 Zellen und zu einer verstärkten Mobilität der Zellen (Tab. 8). Dies ist ein Hinweis auf eine Funktion der Galectine bei der Zellbewegung, die auch in *sud-1* gestört ist. Dieser Aspekt wird später ausführlich experimentell behandelt.

Ein weiterer häufig gefundener Interaktionspartner wird durch den noch unbekannten offene Leserahmen ZK1128.5 (n = 5) kodiert. Die von ZK1128.5 kodierte Proteinsequenz ist homolog zu Swp73/BAF60, einem Protein des SWI/SNF-Komplexes in der Hefe. Der SWI/SNF-Komplex ist an der Regulation des Chromatins beteiligt (Wang *et al.* 1996). Obwohl in der Literatur zu lesen ist, dass die RNA-Interferenz mit diesem Gen keinen abnormalen Phänotyp hervorruft (Maeda *et al.* 2001), wurden auch mit ZK1128.5 RNAi-Experimente durchgeführt. Es konnte jedoch kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp produziert werden (Tab. 8). Zudem weist auch die Membranlokalisation von SUD-1 darauf hin, dass eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes wahrscheinlich ein falsch positiver Kandidat ist.

**Tab. 8:** Die Ergebnisse der RNAi-Experimente mit den häufigsten Interaktionskandidaten. Es wurden junge adulte Wildtyp-Hermaphroditen mit dsRNA des jeweiligen Kandidaten injiziert. (+ = wie Wildtyp, ++ = stark erhöht, – = weniger als Wildtyp).

Gen bzw. Genkombination	Phänotyp	Mobilität der Zellen
<i>vig-1</i>	Wildtyp	+
<i>lec-2</i>	Wildtyp	+
<i>lec-1 + lec-2 + lec-3 + lec-4</i>	Proliferationsarrest mit 50-100 Zellen	++
<i>lec-1</i>	Proliferationsarrest mit 50-100 Zellen	–
<i>lec-3</i>	Proliferationsarrest mit 50-100 Zellen	+
<i>lec-4</i>	Wildtyp	+
<i>lec-5 + lec-6 + lec-7 + lec-8 + lec-9 + lec-10</i>	Proliferationsarrest mit 50-100 Zellen	–
ZK1128.5	Wildtyp	+

Ein wichtiger Test zur Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner ist, cDNA-Bank-Plasmide, die diese Interaktionspartner kodieren, allein in die Hefe zu transformieren und die Transformanten auf Medium zu selektieren, welches nur bei der Expression der Reportergene das Wachstum erlaubt. So kann getestet werden, ob die Interaktionskandidaten allein die Promotoren der Reportergene binden können, um dann mit der aktivierenden Domäne die Expression derselben zu ermöglichen. Dazu wurden Plasmide aus verschiedenen cDNA-Bank-Klonen der häufigsten und interessantesten Kandidaten aus unterschiedlichen cDNA-Bank-Transformationen (*vig-1*, *lec-1*, *lec-2*, *lec-3*, *lec-4*, *lec-5* und ZK1128.5) isoliert und allein in den Hefestamm AH109 retransformiert. Transformanten können nur dann auf Medium ohne Leucin und Histidin und auf Platten ohne Leucin, Histidin und Adenin wachsen, wenn die von ihnen exprimierten *C. elegans* Proteine selbstständig die Promotoren der Reportergene binden können. (Abb. 18). Da Hefeklonen mit VIG-1 allein nicht wachsen können, ist das Wachstum der Klone mit VIG-1 und SUD-1 zusammen vermutlich auf eine artifizielle Interaktion mit dem SUD-1 Protein zurückzuführen. ZK1128.5 konnte in einem von drei Fällen alleine die Reportergene aktivieren. Es ist möglich, dass dieser Kandidat gar nicht mit SUD-1 interagiert hat, und trotzdem ein positives Ergebnis verursacht. Beim Test der Galectine konnten kein Wachstum festgestellt werden (Abb. 18). SUD-1 muss mit den Galectinen interagieren, damit die Hefen wachsen können.

Bei dem Y2H-Screen wurde SUD-1 selbst mehrfach gefunden, T21B10.3 (n = 10). Dies ist ein Hinweis, dass SUD-1 Homopolymere bilden könnte. Die Fähigkeit

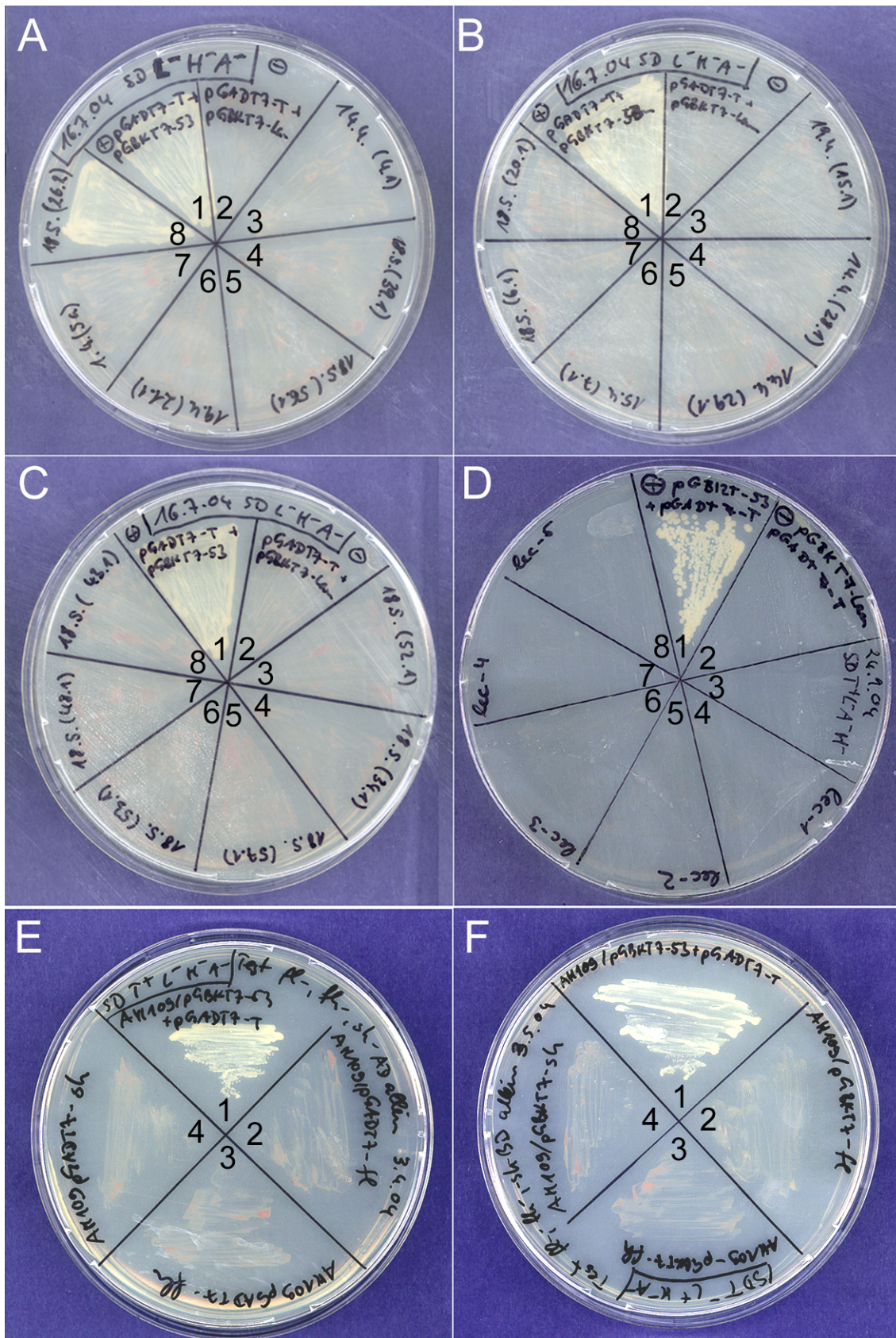
der Dimerisierung ist sowohl bei membranassoziierten als auch bei zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen weit verbreitet, was keinerlei Rückschlüsse auf eine bestimmte Funktion des Proteins zulässt. Zur Verifizierung und weiteren Charakterisierung dieser SUD-1-SUD-1-Interaktion wurden Hefen einzeln und mit allen möglichen Kombinationen der Expressionsvektoren mit den cDNAs des kompletten SUD-1 Proteins, der N-terminalen Hälfte und der C-terminalen Hälfte, jeweils fusioniert mit der DNA-BD oder der AD, transformiert (Tab. 9). Die SUD-1-SUD-1-Interaktion konnte mit verschiedenen Kombinationen reproduziert werden. Die Dimerisierung des *sud-1* Genproduktes scheint also zumindest in einem Y2H-Assay korrekt zu sein. Da es für die weitere Arbeit hier nicht relevant ist möchte ich darauf verzichten aus den Daten ein SUD-1-SUD-1-Interaktionsmodell abzuleiten.

Weitere häufiger auftretende Kandidaten waren Vertreter der Eidotterproteine Vitellogenin [*vit-6* ( $n = 5$ ), *vit-4* ( $n = 1$ ) und *vit-2* ( $n = 1$ )], sowie die bisher unbekannten offenen Leseraster C05C10.5a, dem zu einem Splicing Faktor homologen potentiellen Protein B0001.8 und dem Muskelprotein *dim-1*. Da eine Interaktion von SUD-1 mit Eidotter Proteinen nicht sinnvoll ist und die Embryonen von *sud-1* homozygoten Hermaphroditen auch keine spezifischen Muskeldefekte aufweisen, wurden die Kandidaten *vit-6*, *vit-4*, *vit-2* und *dim-1*, sowie der Splicing Faktor B0001.8 als falsch positiv angesehen.

**Tab. 9:** Interaktionstests der verschiedenen Abschnitte des SUD-1 Proteins untereinander. fl = komplette cDNA, fh = N-terminale Hälfte und sh = C-terminale Hälfte der cDNA. + = Expression der Reportergene vorhanden, – = keine Expression der Reportergene

Kombination	ADE2- und HIS3-Expression
SUD-1 cDNAfl-AD + SUD-1 cDNAfl-BD	+
SUD-1 cDNAfh-AD + SUD-1 cDNAfh-BD	–
SUD-1 cDNAfl-AD + SUD-1 cDNAfh-BD	+
SUD-1 cDNAfl-BD + SUD-1 cDNAfh-AD	–
SUD-1 cDNAfl-AD + SUD-1 cDNAsh-BD	+
SUD-1 cDNAfl-BD + SUD-1 cDNAsh-AD	+
SUD-1 cDNAfh-AD + SUD-1 cDNAsh-BD	+
SUD-1 cDNAfh-BD + SUD-1 cDNAsh-AD	+
SUD-1 cDNAfl-AD	–
SUD-1 cDNAfl-BD	–
SUD-1 cDNAfh-AD	–
SUD-1 cDNAfh-BD	–
SUD-1 cDNAsh-AD	–
SUD-1 cDNAsh-BD	–





**Abb. 18:** Test der wichtigsten Y2H Kandidaten auf die Fähigkeit, die Regortergene allein zu aktivieren. (A) bis (D) Agarplatten mit Hefemedium ohne Leucin, Histidin und Adenin. 1 = Positivkontrolle pGADT7-T+pGBKT7-53, 2 = Negativkontrolle pGADT7-T+pGBKT7-Lam. (A) 6,7,8 = ZK1128.5; 4 = *lec-1*; 3 = *lec-3*; 5 = *lec-4*. (B) 3-8 = *vig-1* (C) 5 = *lec-2*; 3,4,6,7,8 = *vig-1*. (D) 3 = frei; 4 = *lec-1*; 5 = *lec-2*; 6=*lec-3*; 7 = *lec-4*; 8 = *lec-5*. (E) *sud-1* cDNA-AD Klone alleine, (F) *sud-1* cDNA-BD Klone alleine, je 2 = cDNAfl, 3 = cDNAfh, 4 = cDNAsh.

Das Yeast-Two-Hybrid-System ist eine gute Technik, um aus einer cDNA-Bank potentielle Interaktionspartner eines bestimmten Proteins zu finden. Allerdings handelt es sich im Falle dieser Arbeit bei Hefen um ein fremdes Expressionssystem, und die Vielfalt der gefundenen Interaktionspartner macht deutlich, dass diese Methode aus verschiedenen Gründen sehr anfällig gegen artifizielle, falsch positive Interaktionen ist (Van Crieginge und Beyaert, 1999). Die Tatsache, dass *Saccharomyces cerevisiae* zu den Eukaryonten zählt, gewährleistet posttranslationale Modifikationen der exprimierten Proteine, es kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese Modifikationen denen in *C. elegans* identisch sind. Das in dieser Arbeit verwendete Yeast-Two-Hybrid-System beinhaltet mehrere Mechanismen zur Unterdrückung artifizieller Interaktionen, diese können aber nicht garantieren, dass die *C. elegans*-Proteine in der Hefe native Wechselwirkungen eingehen. Daher sollte die Glaubwürdigkeit potentieller Kandidaten nicht nur phänotypisch überprüft werden, sondern ihre Interaktion mit dem untersuchten Protein auch biochemisch nachgewiesen werden.

Bereits parallel zur Vollendung des Yeast-Two-Hybrid-Assays wurde in Vorversuchen mit einer phänotypischen Analyse der interessantesten Kandidaten begonnen. Aufgrund der viel versprechenden Resultate aus Galectin-RNA-Interferenzen, die später beschrieben werden, haben sich diese Interaktionskandidaten als die wahrscheinlichsten herausgestellt. Die Evidenz einer Interaktion von SUD-1 mit den Galectinen wurde durch eine Vielzahl an Experimenten weiter verstärkt, die später ausführlich diskutiert werden.

Eine biochemische Kontrolle von Interaktionen, die in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen gefunden werden, erfolgt üblicherweise durch ein Pull-down-Experiment mit Bakterien. Dabei werden die interagierenden Proteine in *E. coli* überexprimiert und anschließend deren Interaktion nachgewiesen, indem eines der beiden Proteine über ein fusioniertes Affinitätspeptid aufgereinigt wird und dann in einem Western Blot der mitaufgereinigte Interaktionspartner nachgewiesen wird. Dieses bakterielle System entspricht aber meist nicht dem ursprünglichen Organismus der untersuchten Proteininteraktion. Zudem sind Bakterien keine Eukaryoten, weshalb posttranslationale Modifikationen nicht stattfinden und die Proteine oft anders gefaltet werden. Die Gefahr artifizieller Komplexe oder der Unterdrückung nativer Interaktionen aufgrund veränderter physiologischer Bedingungen ist daher in Bakterien eher noch größer als in Hefen. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die SUD-1-Galectin Interaktion in nativen Proteinextrakten aus *C. elegans* *in vivo* nachzuweisen.

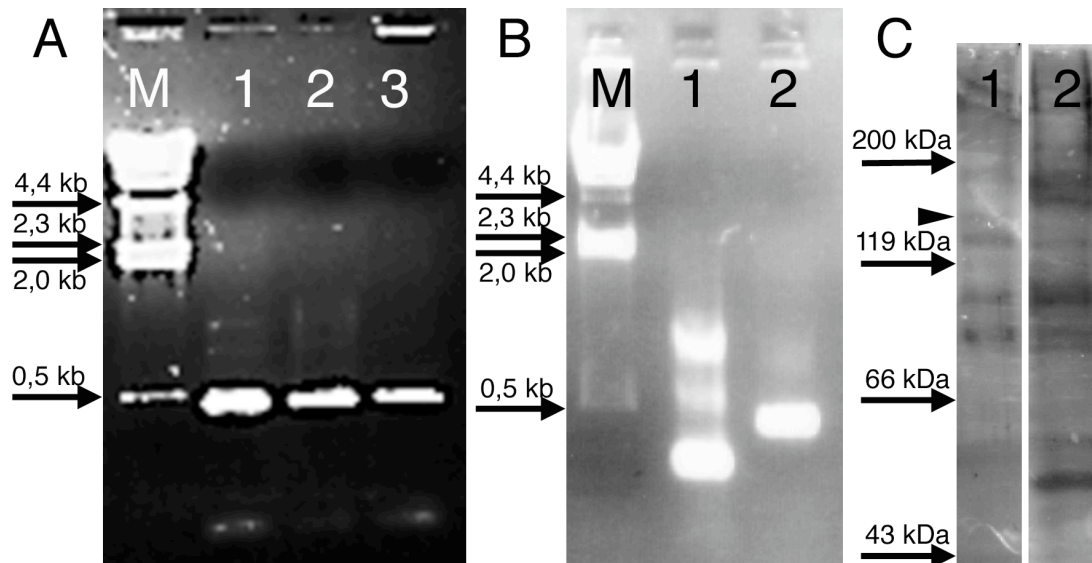


## Die Verifizierung der SUD-1-Galectin-Interaktion mittels TAP-tag

Obwohl mir aus der Literatur noch kein derartiges Experiment aus *C. elegans* bekannt ist, habe ich die TAP-Technologie (=Tandem Affinity Purification) in *C. elegans* angewendet. Bei einer TAP-tag-Aufreinigung (Puig et. al. 2001) wird das gewünschte Protein N-terminal (nTAP) oder C-terminal (cTap) mit drei aneinanderhängenden Proteindomänen fusioniert. Am C-Terminus des C-terminalen TAP-tags befindet sich die IgG-Bindedomäne des ProteinA, mit der das Fusionsprotein aus dem Gesamtproteinextrakt an immobilisiertes Immunglobulin G gebunden werden kann. Der ProteinA-Domäne schließt sich eine TEV-Protease spezifische Sequenz an, durch deren Spaltung mit der TEV-Protease das IgG gebundene Fusionsprotein von der IgG-Matrix eluiert werden kann. Die dritte Domäne innerhalb des TAP-tags ist eine Calmodulin-Bindedomäne (CBD). Mit dieser CBD kann das Fusionsprotein nach Elution mit der TEV-Protease mit immobilisiertem Calmodulin ein zweites Mal aufgereinigt werden, wodurch sich die Reinheit des Fusionsproteins und der daran befindlichen Interaktionspartner stark erhöht. Im Anschluss an die TAP-tag-Aufreinigung werden die Proben in einem SDS-Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen Banden des SDS-Gels können ausgeschnitten und mittels Matrix assoziierter Laser Dissoziation und Ionisierung – <time of flight> (MALDI-tof) analysiert werden, um die Interaktionspartner zu identifizieren.

Für die Durchführung der TAP-tag-Aufreinigung wurde SUD-1 mit dem TAP-tag C-terminal fusioniert. Dazu habe ich das STOP-Codon der genomischen Sequenz von *sud-1* mittels YAC-Rekombination auf einem *sud-1* kodierenden YAC durch die Sequenz des TAP-tags ersetzt. Anschließend habe ich *sud-1* heterozygot mutierte Würmer mit einer Partikelkanone mit diesem SUD-1-cTAP-kodierenden YAC transformiert und unter den Nachkommen der Transformanden *sud-1* mutante Linien gesucht, die durch das YAC gerettet werden. Nach mehreren Transformationsversuchen konnte ich insgesamt drei gerettete Linien finden, von denen aber letztendlich nur zwei langfristig überlebt haben. Ein allgemein beobachtetes Problem ist, dass mit einer Wildtypkopie des mutanten Gens gerettete Linien nach einiger Zeit aussterben. Der Grund dafür ist noch nicht bekannt. Es könnte sein, dass gerade bei maternal wirkenden Genen bevorzugt das Genprodukt an die Nachkommen weitergegeben wird. Die entsprechende Protein kodierende DNA wird als extrachromosomale Arrays, die bei Komplementationen meistens vorliegen - nicht 100%ig vererbt und geht nach mehreren Generationen verloren.

Die *sud-1* komplementierte Linie wurde für den Versuch einer TAP-tag-Aufreinigung verwendet. Zuerst wurde mit PCR die Insertion des TAP-tags in das *sud-1* STOP-Codon auf dem YAC sowie die Präsenz des *sud-1*-TAP-tag-Konstruktes in der komplementierten Linie nachgewiesen und mittels Western Blot eine schwache Expression des SUD-1-cTAP gezeigt. (Abb. 19).

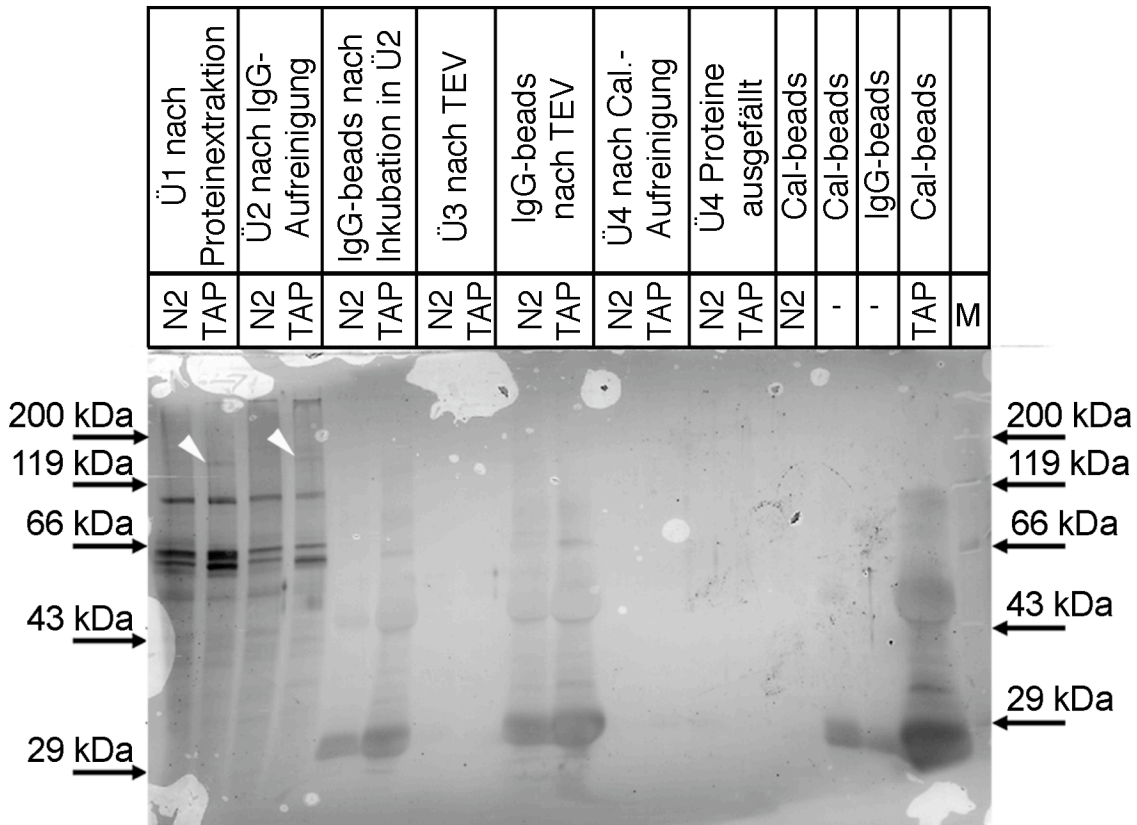


**Abb. 19:** Kontrollen der wichtigsten Arbeitsschritte vor Beginn des TAP-Experimentes. (A) PCR mit drei verschiedenen Hefeklonen (1-3) zum Nachweis der TAP-tag-Integration in das *sud-1* STOP-Codon auf dem YAC. (B) PCR zum Nachweis des *sud-1*-cTAP-Konstruktes in der durch Transformation komplementierten *sud-1*-Linie. Bei dem *sud-1*-cTAP-Konstrukt bindet ein Primer (sud1P9) upstream des STOP-Codons und der zweite Primer (CAB06) ist komplementär zum TAP-tag, wodurch ein 380 bp großes Fragment amplifiziert wird, Spur 1. Die Primer für die PCR im Wildtyp ohne *sud-1*-cTAP-Konstrukt (sud1P7, sud1Pr8) sind komplementär zu Sequenzen upstream und downstream des STOP-Codons mit einem Abstand von ca. 440 bp im Wildtyp, Spur 2. (C) Western Blot zum Nachweis der *SUD-1*-cTAP Expression. 1 = Proteinextrakt aus der komplementierten Linie, 2 = Proteinextrakt aus Wildtyp. Pfeilkopf: die schwache Expressionsbande des *SUD-1*-cTAP Fusionsproteins.

Daraufhin wurde die komplementierte Linie in insgesamt 6 L Flüssigkultur gezogen, um genügend Embryonen für den Zellaufschluss, die Aufreinigung und die anschließende MALDI-tof-Analyse zu erhalten. Da durch das exponentielle Wachstum der Würmer schnell ein sehr hoher Futterbedarf in der Flüssigkultur entsteht (jeder Wurm produziert ca. 200 Nachkommen), habe ich zur Bereitstellung der Futterbakterien in Zusammenarbeit mit Hr. Graßl der Abteilung Biotechnologie im Biotechnikum des Biozentrums zwei 50 L-Fermentationen mit dem Futterbakterium OP-50 durchgeführt.

Die TAP-tag-Aufreinigung wurde mit dem Proteinextrakt aus den Embryonen der TAP-tag-Linie und als Kontrolle mit Proteinextrakt aus Wildtyp Embryonen durchgeführt. Nach jedem Arbeitsschritt der Aufreinigung wurden Proben entnommen und mit SDS-Probenpuffer versehen. Anschließend wurden in einem SDS-Proteingel von jedem Arbeitsschritt die Proben von der TAP-tag-Linie und der Wildtyp-Kontrolle zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet um das TAP-tag-markierte *SUD-1* Protein mit einem CBD-spezifischen Antikörper nachzuweisen (Abb. 20). Es ist erkennbar, dass das *SUD-1*-

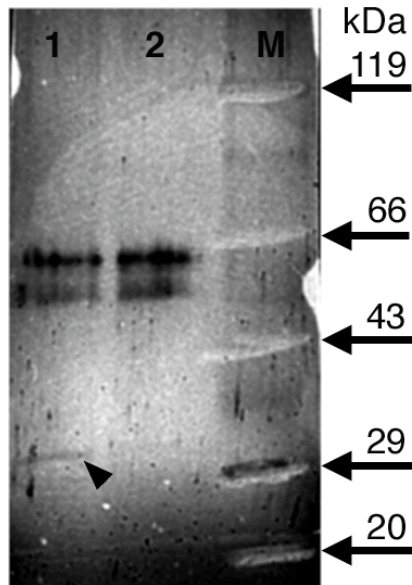
TAP-Fusionsprotein vor und nach der Inkubation mit den IgG-Beads in dem Proteinextrakt der TAP-Linie, jedoch nicht in der Wildtypkontrolle vorhanden ist. In den Proben der IgG-Beads nach der Inkubation und in allen darauf folgenden Proben ist es jedoch nicht wieder zu finden. Dies bedeutet, dass das SUD-1 Protein nicht an die IgG-Sepharose gebunden hat oder bei den darauf folgenden Waschschritten durch zu starke Verdünnung nicht mehr nachweisbar war.



**Abb. 20:** Western-Blot nach der TAP-tag-Aufreinigung. Primärer Antikörper Kaninchen gegen CBD (1:1000), sekundäre Antikörper Ziege gegen Kaninchen, HRP-gekoppelt (1:1500). Zur Signalverstärkung wurde die Membran zusätzlich mit HRP-gekoppeltem Streptavidin inkubiert und die anschließende Reaktion mit dem HRP-Substrat so lange ausgeführt, bis sich die Banden-Intensität nicht mehr gesteigert hat. Neben vielen unspezifischen Banden wurde so das schwach exprimierte SUD-1-cTAP-Fusionsprotein in den Proteinextrakten der TAP-tag-Linie sichtbar (weiße Pfeilköpfe). In allen Aufreinigungsschritten fehlt diese Bande, was darauf hindeutet, dass das Fusionsprotein nicht aufgereinigt wurde. Ü = Überstand, Cal = Calmodulin.

Da die Aufreinigung des SUD-1-cTAP-Fusionsproteins in zwei Schritten gemäß des TAP-tag-Protokolls nicht möglich war, wurde die Methode so verändert, dass das SUD-1-cTAP-Fusionsprotein mit ProteinG gekoppelten magnetischen Beads aus dem Gesamtproteinextrakt aufgereinigt wurde. Anschließend wurde mit einem Western Blot und polyklonalen Antikörpern gegen die Galectine LEC-1, LEC-2 und LEC-3 geprüft, ob diese Galectine als Interaktionspartner mit aufgereinigt wurden, was mit dem Galectin LEC-1 gelungen ist (Abb. 21)

magn. Protein G  
Blot: LEC-1  
(28 kDa)

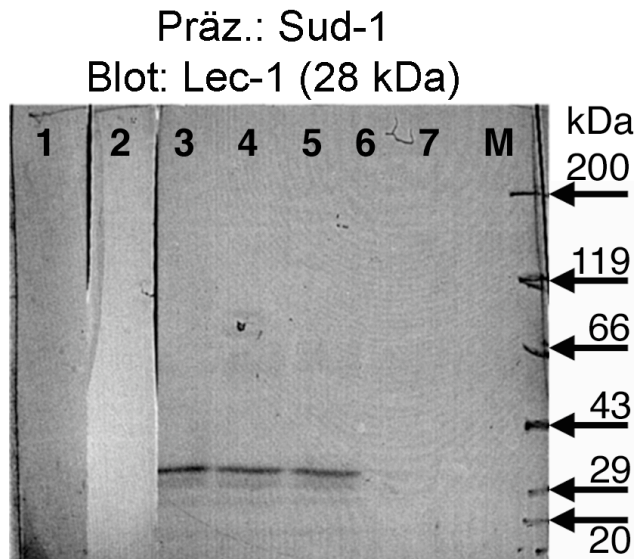


**Abb. 21:** Aufreinigung des SUD-1-cTAP-Fusionsproteins mit magnetischen Beads.

Als primärer Antikörper wurde Serum aus Kaninchen nach Immunisierung gegen LEC-1 verwendet (74, 05 PP, 1:6500), und als sekundärer Antikörper HRP gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500). Zur Signalverstärkung wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin verwendet.

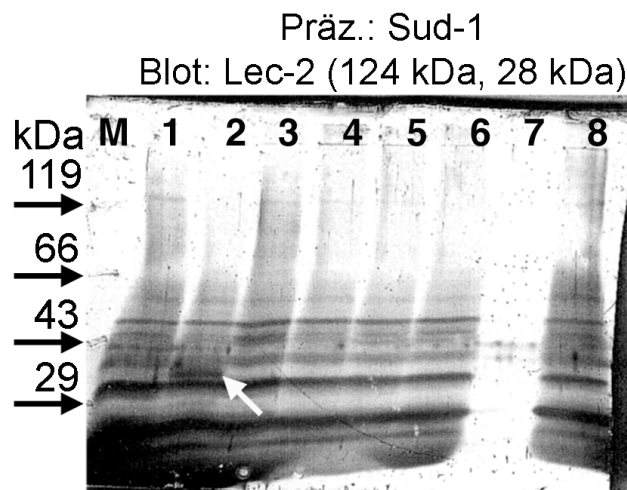
Nach der Aufreinigung konnte das 28 kDa große LEC-1 in der SUD-1-cTAP-Linie (1) nachgewiesen werden (Pfeilkopf), jedoch nicht in der Wildtypkontrolle (2).

Parallel wurde mit dem selbst hergestellten monoklonalen Antikörper gegen SUD-1 versucht, SUD-1 aus Wildtyp-Proteinextrakt zu präzipitieren und anschließend die mit SUD-1 einen Komplex bildenden Galectine durch Copräzipitation nachzuweisen. Dazu wurde zu je 1 ml Proteinextrakt unterschiedliche Mengen von Zellkulturüberstand mit dem monoklonalen Antikörper gegen SUD-1 gegeben, die Mischung auf Eis 30 min inkubiert und dann 15 Minuten hart abzentrifugiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Mengen Zellkulturüberstand sollte sichergestellt werden, dass bei einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Antikörper und Antigen der Antikörper-Antigen-Komplexes nicht mehr löslich ist, der Komplex präzipitiert und abzentrifugiert werden kann. Mit dieser Methode konnte die Interaktion von SUD-1 mit LEC-1, LEC-2 und LEC-3 nachgewiesen werden (Abb. 22 - 25).



**Abb. 22:** Copräzipitation von LEC-1 mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen SUD-1 aus Zellkulturüberstand (ZKÜ) 5B9.

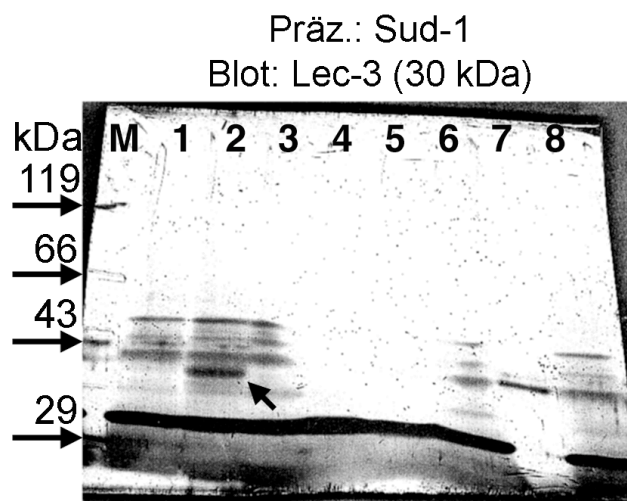
1: Proteinextrakt ohne ZKÜ  
2: Proteinextrakt mit 20  $\mu$ l ZKÜ, nur 2. AK.  
3: 30  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
4: 25  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
5: 20  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
6: 15  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
7: 10  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
Primärer Western Blot-Antikörper gegen LEC-1 (Serum 74, 05, PP, 1:6500). Sekundärer Antikörper gegen Kaninchen (1:1500) und Streptavidin zur Signalverstärkung sind HRP-gekoppelt. LEC-1 copräzipitiert mit 20, 25 und 30  $\mu$ l ZKÜ.



**Abb. 23:** Copräzipitation von LEC-2 mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen SUD-1 aus Zellkulturüberstand (ZKÜ) 5B9.

1: 10  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
2: 20  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
3: 50  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
4: 100  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
5: 350  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
6: 450  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
7: ZKÜ 5B9 alleine  
8: Proteinextrakt ohne ZKÜ

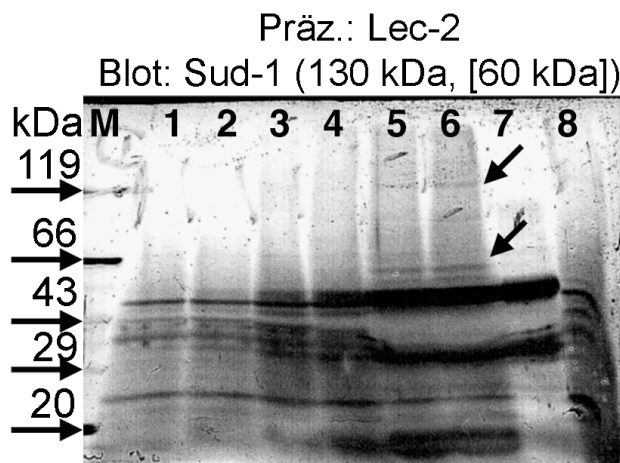
Primärer Western Blot-Antikörper gegen LEC-2 (64, PP, 1:6500). Sekundärer Antikörper gegen Kaninchen (1:1500) und Streptavidin zur Signalverstärkung sind HRP-gekoppelt. LEC-2 copräzipitiert mit 20  $\mu$ l ZKÜ (weißer Pfeil).



**Abb. 24:** Copräzipitation von LEC-3 mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen SUD-1 aus Zellkulturüberstand (ZKÜ) 5B9

1: Proteinextrakt ohne ZKÜ,  
2: Proteinextrakt mit 20  $\mu$ l ZKÜ, nur 2. AK.  
3: 30  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
4: 25  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
5: 20  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
6: 15  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
7: 10  $\mu$ l ZKÜ mit mAK gegen SUD-1  
8: Proteinextrakt ohne ZKÜ  
Primärer Western Blot-Antikörper gegen LEC-3 (75, 08, PP, 1:6500). Sekundärer Antikörper gegen Kaninchen (1:1500) und Streptavidin zur Signalverstärkung sind HRP-gekoppelt. LEC-3 copräzipitiert mit 20  $\mu$ l ZKÜ (schwarzer Pfeil).





**Abb. 25:** Copräzipitation von SUD-1 mit polyklonalen Antikörpern (pAK) aus Serum gegen LEC-2.

- 1: 10  $\mu$ l Serum mit mAK gegen LEC-2
- 2: 20  $\mu$ l Serum mit pAK gegen LEC-2
- 3: 50  $\mu$ l Serum mit pAK gegen LEC-2
- 4: 100  $\mu$ l Serum mit pAK gegen LEC-2
- 5: 350  $\mu$ l Serum mit pAK gegen LEC-2
- 6: 450  $\mu$ l Serum mit pAK gegen LEC-2
- 7: ZKÜ 5B9 alleine
- 8: Proteinextrakt ohne Serum

Primärer Western Blot-Antikörper ist ZKÜ 5B9 (1:5). Sekundärer Antikörper gegen Kaninchen (1:1500) und Streptavidin zur Signalverstärkung sind HRP-gekoppelt. SUD-1 copräzipitiert mit 350  $\mu$ l und 450  $\mu$ l Serum gegen LEC-2 (schwarze Pfeile).

Die im Yeast-Two-Hybrid gefundene Interaktion zwischen SUD-1 und den Galectinen konnte mit biochemischen Methoden reproduziert werden. Die sich daraus ergebende Frage, welche Funktion die Galectine alleine und zusammen mit SUD-1 während der frühen Embryogenese von *C. elegans* haben, wurde mit einer Reihe von RNA-Interferenz-Experimenten untersucht, die im Folgenden nach einer kurzen Einführung in die vielfältige Welt der Galectine beschrieben werden.

## Die Welt der Galectine

Neben den drei bedeutenden biologischen Stoffklassen der Proteine, Nukleinsäuren und Lipide, die die Struktur und Funktion und Vitalität von Organismen regulieren, existiert als vierte Stoffklasse die im Glycom zusammengefasste Gesamtheit der Zuckerverbindungen eines Organismus. Diese Zuckerverbindungen leisten einen bedeutenden Beitrag zur Lebensfähigkeit von Zellen und Organismen (Ohtsubo und Marth, 2006, Freeze, 2006). Nach der Proteinbiosynthese werden die meisten Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit komplexen Oligosaccharid-Verbindungen, bestehend aus N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin und Mannose, posttranslational modifiziert. Diese Modifizierungen sind eine Bedingung für die korrekte Funktionalität der Proteine, und je nach Zusammensetzung der Zucker kann ein und dasselbe Protein unterschiedliche Funktionen ausüben. So wird zum Beispiel die Affinität des Notch-Rezeptors zu unterschiedlichen Liganden durch unterschiedliche Glykosylierungsmuster reguliert (Haltiwanger *et al.* 2004) und die Aktivität und Lokalisation von Enzymen hängt von deren Glykosylierung ab (Ishmael *et al.* 2006, Kioi *et al.* 2006). Die als Glykokalyx bezeichnete Schicht aus besonders großen Oligosacchariden auf der Oberfläche der Zellen dient der Zelle zum Schutz und als Anker für die Zell-Zell und Zell-Matrix vermittelnde Adhäsion (Mulivor und Li-

powsky, 2002, Stonebraker *et al.* 2004, Fukuda, 1995). Eine Modulation der Adhäsion und Funktionalität von Proteinen durch Zucker ermöglicht mit wenigen Bausteinen eine sehr große Komplexität an Kodierungsmöglichkeiten. Die Glykosylierungen bestehen aus verschiedenen Saccharidmonomeren (die häufigsten sind Glucose, Mannose, Fucose, Galactose, Xylose, Arabinose), welche über verschiedene Verbindungspunkte (1,2(3,4,6)), anomerische Positionen ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) und Ringgrößen (Furanosen oder Pyranosen) und in der D- oder L-Form aneinandergekettelt werden. Zudem weisen Oligosaccharidketten Verzweigungen auf, wodurch sich die Anzahl der möglichen Strukturen zusätzlich erhöht.

Die korrekte zelluläre Interpretation dieses komplexen „Zuckercodes“ erfolgt durch hochspezifische Zucker-Liganden und Zucker-Rezeptoren, die zusammenfassend als Lectine bezeichnet werden (Gabijs *et al.* 2004, Nilsson, 2003, Gabiys *et al.* 2003). Die Galectine gehören zu der Stoffklasse derjenigen Lectine, die über die spezifische Bindung an Oligosaccharidstrukturen mit anderen Proteinen interagieren. Galectine binden spezifisch über eine <carbohydrate recognition-domain> (CRD) die endständige  $\beta$ -Galactose an Glykokonjugaten (Roger *et al.* 2001). Die Proteinfamilie der Galectine wird aufgrund ihrer Struktur in drei Varianten klassifiziert: die <prototype>-Galectine besitzen eine CRD. <chimera-type>-Galectine bestehen aus einer CRD und einer den N-Terminus verlängernden Proteindomäne. Die <tandem-repeat-type>-Galectine schließlich kennzeichnen sich durch zwei CRD aus, welche über ein Linkerpeptid kovalent miteinander verbunden sind. Die Proteine aller Galectin-Klassen können über Sequenzabschnitte außerhalb der CRD Homodimere bilden (Leppanen *et al.* 2005), um so ihre Affinität zu bestimmten Oligosacchariden zu verstärken. Die Interaktion der Galectine über ihre Zucker bindende Domäne mit Membranproteinen benachbarter Zellen oder der ECM leistet einen wichtigen Beitrag zur Zelladhäsion und Zellmigration (Perillo *et al.* 1997, Kaltner und Stierstorfer, 1998), weswegen sie in vielen unterschiedlichen Organismen untersucht werden (Shoji *et al.* 2003, Vasta *et al.* 2004, Pace *et al.* 2004). Die Galectine tragen zur Zelladhäsion und Zellmigration z.B. von Nervenzellen bei (Sango *et al.* 2004, Fukaya *et al.* 2003, Horie *et al.* 2004), sind in die Regulation der Apoptose von T-Zellen (Hernandez *et al.* 2002) und Tumoren involviert (Oka *et al.* 2005, Zubieta *et al.* 2006) und sind für die Angiogenese von Tumoren essentiell (Thijssen *et al.* 2006). Die Funktionalität der Galectine ist von einer korrekten Proteindosis abhängig, denn konzentrationsabhängig können die Galectine entgegengesetzte Wirkungen auf die Zellen haben (Biron *et al.* 2006, Zick *et al.* 2004). Da die Galectine keine Transmembrandomänen oder Signalpeptide zur Sekretion haben, werden sie auf einem alternativen, noch nicht vollständig verstandenen Weg an die Zelloberfläche transportiert (Cooper *et al.* 1990, Sato *et al.* 1994). Neben der Vermittlung der Zelladhäsion werden die Galectine auch für intrazelluläre Prozesse benötigt, wie zum Beispiel zur Regulation von Zelltod, Zellwachstum und Proliferation (Hernandez *et al.* 2002, Yoshii *et al.* 2002). Weil die Galectine an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle unterschiedliche Aufgaben erfüllen, ist ihre Funktion an bestimmte Kompartimente gekoppelt (Hsu *et al.* 2004).

## Galectine in der Embryonalentwicklung von *C. elegans*

Bei der Genomsequenzierung von *C. elegans* sind bisher 11 verschiedene Galectine identifiziert und von *lec-1* bis *lec-11* durchnummeriert worden. Einige dieser vorhergesagten Proteine wurden bereits biochemisch in Bezug auf ihre Affinität zu  $\beta$ -Galactose analysiert (Hirabajashi *et al.* 1992, Arata *et al.* 1997, Arata *et al.* 2001). Bei anderen vorhergesagten Galectinen sind noch keine derartigen Experimente durchgeführt worden und sie sind lediglich aufgrund starker Homologien zu bereits bekannten Galectinen in *C. elegans* als solche annotiert worden. Bei den *C. elegans*-Galectinen *lec-1* bis *lec-5* handelt es sich um Galectine des <tandem-repeat>-Typs, und bei den Galectinen *lec-6* bis *lec-11* um Galectine des <proto>-Typs (Tab. 10).

**Tab. 10:** Übersicht über die bisher bekannten Galectine im *C. elegans*-Genom und deren bisher bekannte Funktion laut der *C. elegans*-Datenbank <wormbase.com>.

Galectin	MW	Struktur-Typ	Funktion (nach „wormbase“)
<i>lec-1</i>	27 kDa	tandem-repeat	bindet Zucker <i>in vitro</i>
<i>lec-2</i>	29 kDa, 124kDa	tandem-repeat	Zell Adhäsion, Apoptose, Proliferation
<i>lec-3</i>	28 kDa	tandem-repeat	NN
<i>lec-4</i>	28 kDa	tandem-repeat	vorhergesagtes Galectin, bindet Zucker <i>in vitro</i>
<i>lec-5</i>	31 kDa	tandem-repeat	NN
<i>lec-6</i>	14 kDa	proto	Zell Adhäsion, Apoptose, Proliferation
<i>lec-7</i>	17 kDa	proto	NN
<i>lec-8</i>	18 kDa	proto	NN
<i>lec-9</i>	14 kDa	proto	vorhergesagtes Galectin, bindet Zucker <i>in vitro</i>
<i>lec-10</i>	19 kDa	proto	bindet Zucker <i>in vitro</i>
<i>lec-11</i>	23 kDa	proto	bindet Zucker <i>in vitro</i>

Ein Sequenzvergleich der *C. elegans*-Galectine *lec-1* bis *lec-11* mit der Protein-Datenbank NCBI-Blast zeigt ihre Homologie zu den Galectinen anderer Organismen. Die bekannten zellbiologischen Funktionen der Galectine in anderen Organismen können als Hinweis auf die Funktionen der Homologe in *C. elegans* dienen (Tab. 11). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird und eigentlich auch zu erwarten ist, haben die Galectine in *C. elegans* ähnliche Funktionen wie in anderen Systemen in Zelladhäsion, Zellmigration und Apoptose. Die Funktion der Galectine wurde allerdings hauptsächlich aus Zellkulturexperimenten abgeleitet. *C. elegans* bietet mit seinen vorzüglichen experimentellen Werkzeugen die Chance, die Funktion der Galectine bei der Embryogenese *in vivo* im Organismus zu analysieren.



**Tab. 11:** Zu *C. elegans* Galectinen homologe Galectine anderer Organismen und zellbiologische Funktion der homologen Galectine

<b><i>C. elegans</i> Galectin</b>	<b>Homologes Galectin (Organismus)</b>	<b>Funktion</b>
<i>lec-1</i>	xgalectin-IIIa, -IIIb ( <i>Xenopus</i> ) Lgals9 (Maus) Galectin 4 (Maus) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> ) Galectin 8 ( <i>homo sapiens</i> )	Zelladhäsion Zelladhäsion, Apoptose Immunantwort Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion, Zellmigration
<i>lec-2</i>	Lgals9 (Maus) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> ) xgalectin-IIa, -IVa ( <i>Xenopus</i> )	Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion
<i>lec-3</i>	Galectin 9 (Maus) Galectin 4 (Maus) xgalectin-IIIb ( <i>Xenopus</i> ) Galectin 4 ( <i>homo sapiens</i> )	Zelladhäsion, Apoptose Immunantwort Zelladhäsion Zelladhäsion
<i>lec-4</i>	xgalectin-IIIa, -IIIb, -IIa, -VIa, -VIIIa ( <i>Xenopus</i> ) Galectin 4 (Maus) Galectin 6 ( <i>homo sapiens</i> ) Galectin 7 ( <i>homo sapiens</i> ) Galectin 8 ( <i>homo sapiens</i> ) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> )	Zelladhäsion Immunantwort NN Apoptose Zelladhäsion, Zellmigration Zelladhäsion, Apoptose
<i>lec-5</i>	Lgals9 (Maus) xgalectin-IIa, -IIIa ( <i>Xenopus</i> ) Galectin 4 (Maus) Galectin 6 (Maus) Galectin 8 (Maus) Galectin 8 ( <i>homo sapiens</i> )	Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion Immunantwort Immunantwort Zelladhäsion Zelladhäsion, Zellmigration
<i>lec-6</i>	xgalectin-IIa ( <i>Xenopus</i> )	Zelladhäsion
<i>lec-7</i>	Galectin 6 (Maus) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> )	Immunantwort Zelladhäsion, Apoptose
<i>lec-8</i>	Galectin 8 ( <i>rattus n.</i> ) Galectin 8 (Maus) Galectin 8 ( <i>homo sapiens</i> )	Zelladhäsion Zelladhäsion Zelladhäsion, Zellmigration
<i>lec-9</i>	Galectin 9 (Maus) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> ) xgalectin-IIa, IVa ( <i>Xenopus</i> )	Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion
<i>lec-10</i>	Galectin 4 (Maus) Galectin 6 (Maus) Galectin 9 ( <i>homo sapiens</i> ) Galectin 8 ( <i>rattus n.</i> )	Immunantwort Immunantwort Zelladhäsion, Apoptose Zelladhäsion

In veröffentlichten genomweiten RNAi-Screens wurde nur ein Galectin gefunden, das bei RNA-Interferenzen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp oder gar embryonale Letalität hervorruft (*lec-9*; Madea *et al.* 2001, Kamath *et al.* 2003), was aus meiner Sicht verwunderlich scheint, da in meinen Experimenten, wie später dargestellt wird, die Galectine *lec-1*, *lec-3* und *lec-5* embryonal letal sind, das vorher als letal beschriebene *lec-9* jedoch nicht. Dies zeigt die Probleme der RNA-Interferenz-Technologie auf. Die bisherige Literatur über Galectine in *C. elegans* beschränkt sich auf biochemische Untersuchungen zur Bindungsaffinität gegenüber unterschiedlichen Oligosaccharidresten (Arata *et al.* 1997, Arata *et al.* 2001), und so ist die zellbiologische und physiologische Funktion dieser Proteine in *C. elegans* noch weitgehend unbekannt. Um mit RNA-Interferenz die zellbiologische Funktion der Galectine in der Embryonalentwicklung des Fadenwurms zu untersuchen, habe ich verschiedene Galectine aus einer *C. elegans* - cDNA - Bank amplifiziert und kloniert (Details siehe Material und Methoden).

## Phänotypische Analyse der Galectine mit RNA Interferenz

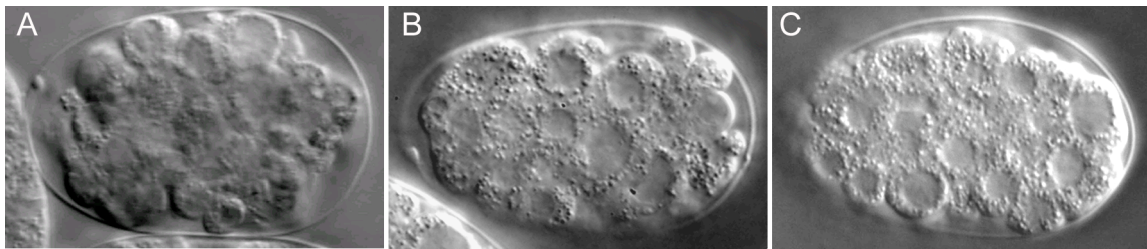
Bei 4D-mikroskopischen Untersuchungen von Embryonen nach RNAi-Experimenten mit unterschiedlichen Galectinen, die einzeln oder in Kombination inaktiviert wurden, wurden zwei Phänotypen erkannt. Der erste ist ausgesprochen drastisch und kann zunächst formal als zu dem vom *sud-1* Phänotyp entgegengesetzten Phänotyp eingeordnet werden. Die Zellproliferation der embryonalen Zellen arretiert sehr früh in der Embryonalentwicklung mit ca. 50 bis 100 Zellen.

## Einfluss der Galectine auf die Zellproliferation

In den ersten Experimenten zur phänotypischen Charakterisierung der Kandidaten aus dem Yeast-Two-Hybrid Screen wurde gezeigt, dass die RNA-Interferenzen gegen LEC-2 und LEC-4 keinen Effekt haben, während es bei den RNAi-Experimenten gegen LEC-1, LEC-3 und LEC-5 zu einem frühen Proliferationsarrest der Zellen kommt (Abb. 26). Die RNA-Interferenz gegen die Galectin-Kombination LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4 bewirkt in *sud-1* und Wildtyp Embryonen den gleichen Phänotyp (Abb. 34). Alle anderen getesteten Galectine (LEC-6, LEC-7, LEC-8, LEC-9, LEC-10) bewirken einzeln inaktiviert keinen Phänotyp (Tab. 12). Interessanterweise stimmt diese Unterscheidung in Galectine mit embryonalem Phänotyp (LEC-1 bis LEC-5) und Galectine ohne embryonalen Phänotyp (LEC-6 bis LEC-10) mit der strukturellen Differenzierung der Galectine in <tandem-repeat>-Typ - und <proto>-Typ-Galectine überein. Eine derartige funktionelle Einteilung der Galectine, gekoppelt mit verschiedenen Entwicklungsstadien eines Organismus, ist in der Literatur bislang noch nicht bekannt.

**Tab. 12:** Ergebnisse der RNAi-Experimente mit einzelnen Galectinen in Wildtyp. Aufgelistet sind die Anzahl der analysierten Embryonen, der prozentuale Anteil der Embryonen mit 50 – 100 Zellen und der Embryonen ohne veränderten Phänotyp.

Galectin	Anzahl	50-100 Zellen	Wildtyp
<i>lec-1</i>	7	100% (n=7)	
<i>lec-2</i>	100		100% (n=100)
<i>lec-3</i>	21	100% (n=21)	
<i>lec-4</i>	5		100 % (n=5)
<i>lec-5</i>	24	100% (n=24)	
<i>lec-6</i>	50		100% (n=50)
<i>lec-7</i>	50		100% (n=50)
<i>lec-8</i>	56		100% (n=56)
<i>lec-9</i>	65		100% (n=65)
<i>lec-10</i>	57		100% (n=57)



**Abb. 26:** Phänotypen am Ende der Entwicklung in dem RNAi-Experiment mit Galectinen. (A) *lec-1*, (B) *lec-3*, (C) *lec-5*.

Bei der Analyse der ersten Inaktivierung von Galectin-Kombinationen fiel mir auf, dass verschiedene Kombinationen unterschiedliche Zellzahlen im Embryo bewirken, dabei traten auch sporadisch Embryonen mit zu vielen Zellen auf. Deshalb habe ich systematisch eine große Anzahl von Kombinationen abgearbeitet, um eventuell einen Zusammenhang zwischen der Kombination der Galectine und der Proliferation der Zellen zu erkennen. Bei einer Kombination (LEC-2+LEC-4) konnte keine vom Wildtyp abweichende Entwicklung festgestellt werden, und bei allen anderen Kombinationen, außer denen von Kombination LEC-1, LEC-2 und LEC-4 schwankte die Zellzahl nur zwischen 50-100 Zellen und 100-200 Zellen. Die Verhältnisse zwischen diesen Zellzahlen sind unterschiedlich, allerdings erscheint mir dies nicht weiter interessant (Tab. 13, Abb. 27). Dagegen ist das phänotypische Spektrum der Kombination von LEC-1+LEC-2 und von LEC-1+LEC-2+LEC-4 äußerst interessant. Es gibt einige Wildtyp Embryonen, einen verfrühten Zellproliferationsarrest, aber auch eine exzessive Zellproliferation, die dem *sud-1* Phänotyp sehr ähnlich ist.

**Tab. 13:** Ergebnisse der RNAi Experimente mit verschiedenen Galectin Kombinationen.  
n = Anzahl der untersuchten Embryonen.

Kombination	n	50-100 Zellen	100-200 Zellen	Wildtyp	mehr Zellen als Wildtyp
<i>lec-1 + lec-2</i>	286	21,67% (n=62)	59,79% (n=171)	15,03% n=43)	4,54% (n=13)
<i>lec-1 + lec-3</i>	363	61,98% (n=221)	38,01% (n=138)		
<i>lec-1 + lec-4</i>	505	47,52% (n=240)	52,47% (n=265)		
<i>lec-1 + lec-5</i>	189	94,71% (n=179)	5,29% (n=10)		
<i>lec-2 + lec-3</i>	128	91,40% (n=117)	8,59% (n=11)		
<i>lec-2 + lec-4</i>	97			100% (n=97)	
<i>lec-3 + lec-4</i>	332	91,26% (n=303)	8,73% (n=29)		
<i>lec-2 + lec-5</i>	120	82,50% (n=99)	17,50% (n=21)		
<i>lec-1 bis lec-4</i>	252	86,50% (n=218)	13,49% (n=34)		
<i>lec-1 bis lec-5</i>	527	88,61% (n=467)	12,38% (n=60)		
<i>lec-5 bis lec-10</i>	2	100% (n=2)			
<i>lec-6 bis lec-10</i>	15			100% (n=15)	
<i>lec-1 + lec-2 + lec-4</i>	6	33% (n=2)			66% (n=4)
<i>lec-1 + lec-3 + lec-4</i>	330	88,48% (n=292)	11,51% (n=38)		
<i>lec-2 + lec-3 + lec-4</i>	220	80,45% (n=177)	19,54% (n=43)		
<i>lec-1 + lec-2 + lec-5</i>	333	85,85% (n=285)	14,14% (n=48)		
<i>lec-3 + lec-4 + lec-5</i>	73	79,45% (n=58)	20,54 (n=15)		

Tab. 13: Fortsetzung.

<i>lec-1 + lec-3 + lec-5</i>	237	84,81% (n=201)	15,19% (n=36)		
<i>lec-1 + lec-2 + lec-3</i>	270	94,44% (n=255)	5,56% (n=15)		

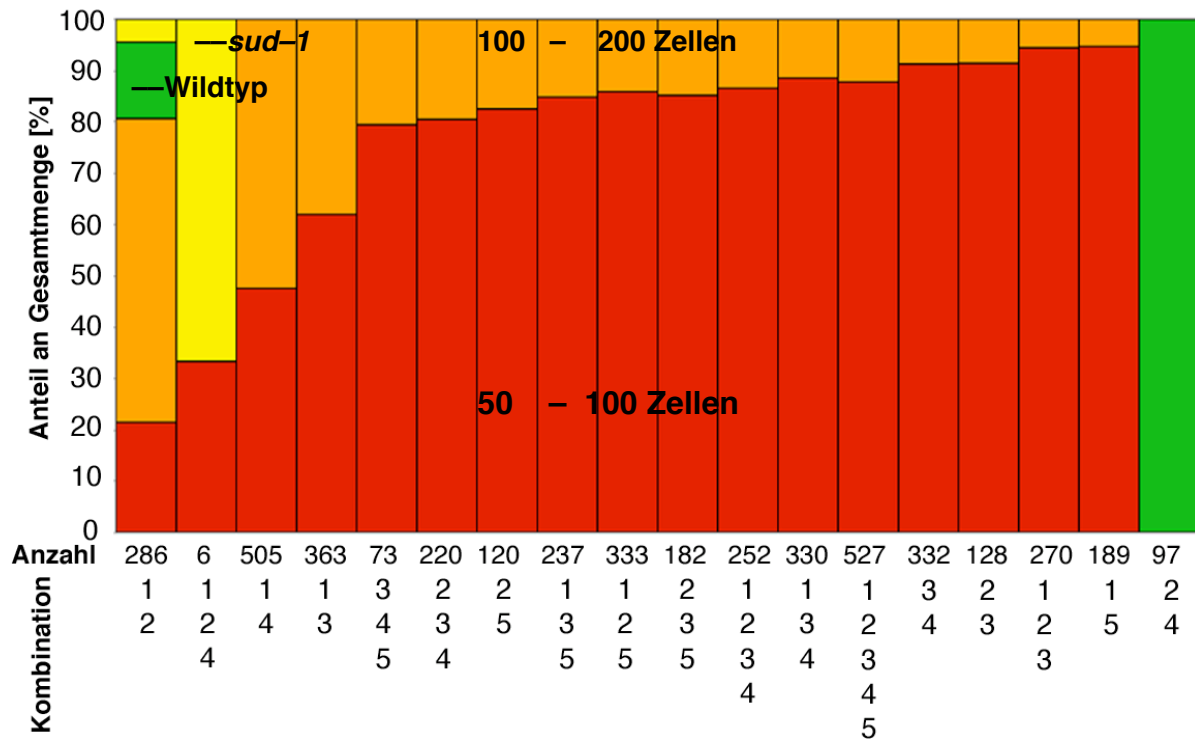


Abb. 27: Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 16. rot = 50-100 Zellen, orange = 100-200 Zellen, grün = Wildtypen, gelb = mehr Zellen als im Wildtyp.

## RNA-Interferenz mit speziellen Galectin-Kombinationen führt zum *sud-1* Phänotyp

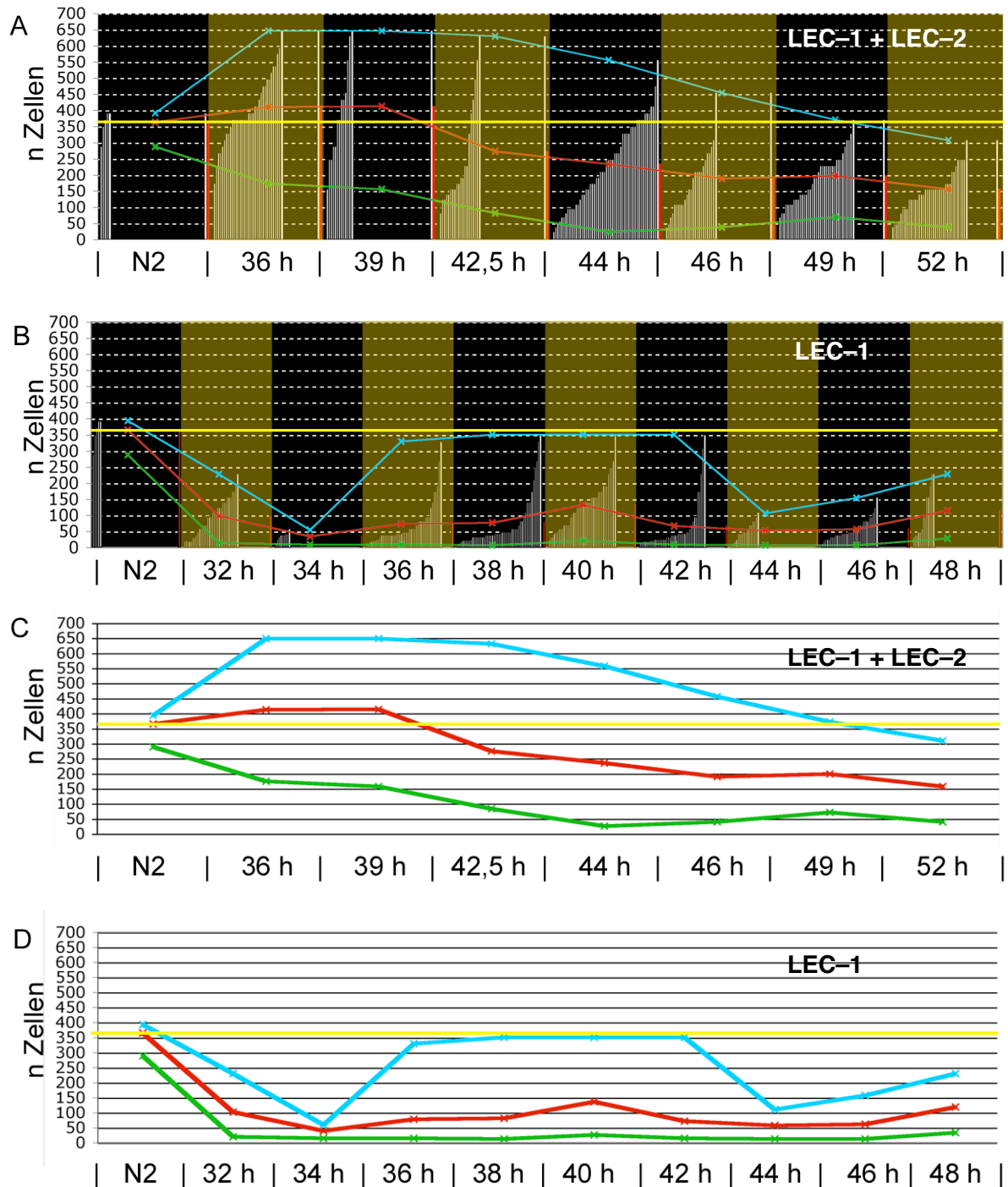
Das Auftreten des *sud-1* Phänotyps bei der Kombination von LEC-1+LEC-2 und LEC-1+LEC-2+LEC-4 ist äußerst interessant, da es der erste phänotypische Hinweis ist, dass SUD-1 mit Galectinen interagiert und es sehr wahrscheinlich ist, dass die in *sud-1* Embryonen beobachtete "onkogene" Zellüberproliferation von einer Galectin abhängigen Zelladhäsionsmodulation reguliert wird. Allerdings waren die "*sud-1* Embryonen" nur einer von drei Phänotypen. So war die Frage, wie es möglich ist, dass bei einem RNAi-Experiment mit einem Gemisch von LEC-1+LEC-2 gleichzeitig Embryonen mit zu vielen und zu wenig Zellen sowie Wildtyp Embryonen entstehen. Um die Dinge noch zu komplizieren hat eine Komponente des Gemisches (LEC-2) alleine keinen Einfluss auf die Embryogenese, und die andere Komponente (LEC-1) verursacht allein nur zu wenig Zellen (Tab. 12).

Das Phänomen, dass so viele verschiedene Phänotypen auftreten, ist möglicherweise damit zu erklären, dass in einem typischen RNAi-Experiment verschiedene Aktivitätsdosen auftreten können, die in der Wirkungsweise der RNA-Interferenz begründet sind. Nach Injektion der doppelsträngigen RNA (dsRNA) tritt, abhängig vom untersuchten Gen, nach fünf bis 36 Stunden der RNAi-Effekt ein. Die dsRNA wird durch den Proteinkomplex DICER in kurze dsRNA-Bruchstücke gespalten. Diese Stücke werden anschliessend von dem Proteinkomplex RISC abgebaut oder in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt, die sich an die komplementäre endogen gebildete mRNA anlagern. Dort ermöglichen sie, als Primer fungierend, die Synthese des komplementären RNA-Stranges an der endogenen mRNA, die dann doppelsträngig ist und wieder von DICER in kleine Stücke zerschnitten wird. RISC baut dann auch diese endogen synthetisierte dsRNA ab oder trennt sie in die Einzelstränge auf, die sich erneut an endogene mRNA anlagert und so weiter (Hannon *et al.* 2002). Es entwickelt sich ein selbst verstärkender Kreislauf an dsRNA-Abbau und dsRNA-Synthese, die dann wieder abgebaut wird. Zu Beginn der RNA-Interferenz ist noch die ursprüngliche Menge an endogen produzierter mRNA vorhanden, die mit zunehmender Dauer der Interferenz exponentiell abgebaut wird. Nach einer von der ursprünglichen Konzentration der endogenen mRNA abhängigen Dauer hat der RNAi-Effekt seine maximale Stärke erreicht und die endogene mRNA wurde auf ein Minimum oder gar vollständig abgebaut. Dann steht für DICER und RISC keine dsRNA mehr zur Verfügung, die Proteinkomplexe werden abgebaut und es wird wieder neue mRNA des entsprechenden Proteins synthetisiert. Die Konzentration des von der mRNA kodierten Proteins wird demnach über die Zeitspanne der RNA-Interferenz exponentiell auf ein Minimum oder gar auf Null reduziert, und anschließend wieder der endogen notwendigen Konzentration angeglichen (Takahashi *et al.* 2006).

Die beobachtete Varianz der terminalen Zellzahl in Embryonen nach RNA-Interferenzen gegen Galectin-Kombinationen bestärkt mich im Zusammenhang mit dem gerade beschriebenen Modell des RNAi-Mechanismus in der Hypothese, dass die Funktion der Galectine sensitiv gegenüber Konzentrationsänderungen ist. Diese Hypothese wurde getestet, indem die Anzahl der produzierten Zellen pro Embryo zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Beginn des RNAi-Effektes analysiert wurde.

## Die Funktion der Galectine ist konzentrationsabhängig

Es wurde ein RNAi-Langzeitexperiment gegen LEC-1, LEC-2 und die Kombination LEC-1+LEC-2 mit je 70 Wildtyp-Hermaphroditen durchgeführt. Zu Beginn der Interferenz nach 32 Stunden und dann alle 2-3 Stunden habe ich von sieben Würmern alle zu diesem Zeitpunkt in ihren Gonaden befindlichen Embryonen für die 4D-Mikroskopie auf einem Objektträger präpariert. Von dem frühesten Embryo auf jedem Präparat wurde mit einem 4D-Mikroskop die Entwicklung bis zum Ende aufgenommen, um sicherzustellen, dass sich alle Embryonen fertig entwickelt haben. Alle auf dem Präparat befindlichen Embryonen wurden dann mit dem 4D-Mikroskop in der mittleren Fokusebene dokumentiert. Da die Zellzahl innerhalb eines Embryos mit der Größe der Zellen korreliert, wurden von allen Embryonen die Zellen gezählt, die am äußersten Rand im Embryo liegen. Mit einer Kalibrierkurve aus den Zellzahlen von Wildtyp Embryonen in definierten Entwicklungsstadien wurde die tatsächliche Zellzahl berechnet. Bei der RNA-Interferenz gegen LEC-2 alleine konnte auch im Zeitkurven-Experiment kein einziges nekrotisches Embryo gefunden werden. LEC-1 bewirkt schon früh eine über die Dauer der Interferenz nur leicht schwankende Reduktion der terminalen Zellzahl unter 200 Zellen. Die Kombination von LEC-1 und LEC-2 zeigt ein ganz anderes phänotypisches Muster. Zu Beginn der RNA-Interferenz entstehen gleichzeitig Embryonen mit einer stark erhöhten und reduzierten Zellzahl, und mit der Zeit nimmt die Anzahl an überproliferierenden Embryonen ab (Abb. 28). Die sparsamste Erklärung für dieses Phänomen ist, dass der "*sud-1* Phänotyp" nur in einem spezifischen Aktivitätsfenster der Galectine auftritt. Da die Interferenz zunächst schwach ist und dann stärker wird ist es wahrscheinlich, dass eine geringe Abnahme der Aktivität beider Galectine zur Überproliferation der Zellen führt, während eine stärkere Inaktivierung dann zu einer Störung der Zellteilungen selbst führt. Eine formelle Interpretation des beobachteten Phänomens könnte vielleicht so aussehen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Wirkung von LEC-2 nur auf einen Verdünnungseffekt des RNAis von LEC-1 zurück zu führen ist, da eine Doppelinaktivierung mit anderen Galectinen (LEC-3, LEC-4 und LEC-5) keine Wirkung hat. Da die Inaktivierung von LEC-2 alleine keine Wirkung hat, könnte dieses Galectin formell ein Inhibitor der Adhäsion sein. Werden nun ein Aktivator (LEC-1) und ein Inhibitor gleichzeitig in ihrer Wirkung reduziert, kann es zu einer spezifisch verminderten Aktivität kommen, die zu der beobachteten Überproliferation führt. Anscheinend führt eine Ausschaltung von SUD-1 zu einem ähnlichen Adhäsionsdefekt.



**Abb. 28:** Zeitkurven von RNAi-Experimenten. Die berechnete Anzahl der Zellen ist gegen die Dauer des RNAi-Experimentes aufgetragen. Gelbe Linie: Mittelwert von vier Wildtyp Embryonen, blaue Kurve: Maximum-Werte, rote Kurve: Mittelwerte, grüne Kurve: Minimum-Werte (A) *lec-1+lec-2* gezählte Zellen und (B) *lec-1* gezählte Zellen. Jeder weiße Balken repräsentiert den Wert von einem Embryo. (C) und (D) Separate Darstellung der Kurven aus (A) und (B). Die entsprechenden Werte siehe Anhang.

Meine eben dargestellte Interpretation ist eine der möglichen, aber keine zwingende. Sie steht allerdings damit im Einklang, dass die Galectine scheinbar in einem System stark vernetzter Funktionen wirken. Der Ausfall einzelner Galectine kann in einem solchen Szenario durch andere Galectine abgepuffert werden. Wer-



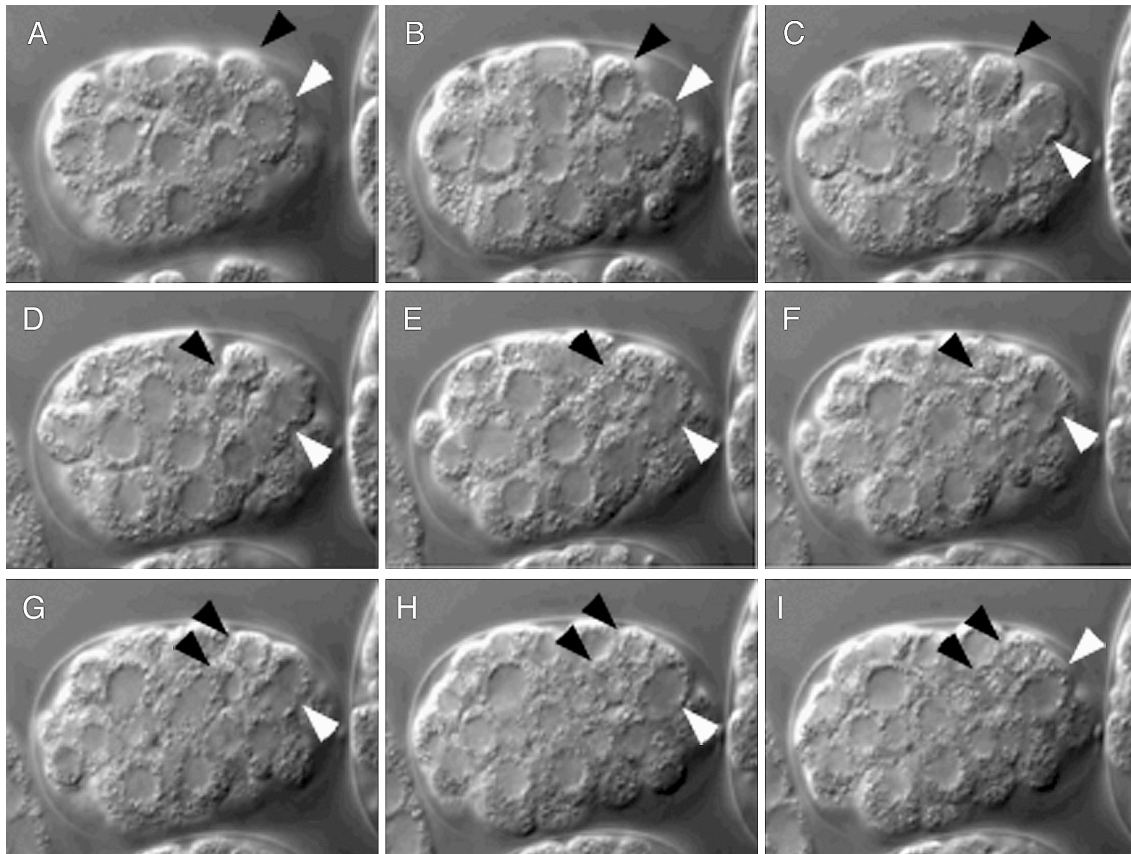
den gleichzeitig zu viele Komponenten des Galectin-Systems inhibiert, so sind die Redundanzen nicht mehr gegeben und die Defekte werden drastischer. Beispiele für die Konzentrationsabhängigkeit der Galectine sowohl bezüglich der Zellproliferation als auch der Zelladhäsion in *in vitro* Systemen sind in der Literatur zu finden. Galectin-8 fungiert in Zellkultur als immobilisiertes Matrixprotein auf der Zelloberfläche als Ligand von Integrinrezeptoren adhäsionsfördernd. Ist Galectin-8 im Überschuss als löslicher Ligand vorhanden, bildet es mit Integrinen Komplexe und verhindert die Zelladhäsion (Zick *et al.* 2004). Aufgrund der strukturellen Homologie des <tandem-repeat-type> Galectin-8 zu den untersuchten Galectinen LEC-1 und LEC-2 in *C. elegans* könnten diese auf eine ähnliche Wirkungsweise die Zelladhäsion modulieren. Galectin-1 hingegen ist ein konzentrationsabhängiger Regulator der Zellproliferation (Lipsick *et al.* 1980, Biron *et al.* 2006). *In vitro*-Experimente mit rekombinantem Galectin-1 (mGBP) haben gezeigt, dass dieses Galectin bei geringen Konzentrationen das Wachstum der Zellen inhibiert (Wells *et al.* 1999, Cho *et al.* 1996, Blaser *et al.* 1998) und das Galectin-1 bei höheren Konzentrationen mitogen wirkt (Scott *et al.* 2004).

Wie die Störung der Zelladhäsion durch Galectin-RNAi zu einer Reduzierung der Zellzahl führt, konnte durch die bisherigen Experimente nicht erklärt werden. Um die Funktionalität der Galectine besser verstehen zu können, war eine genauere Analyse der Embryonen nach RNA-Interferenzen gegen Galectine mit der 4D-Mikroskopie nötig.

## **Die Funktion der Galectine bei der Zellteilung**

### **Der Knockdown von Galectinen führt zu Endoreplikationen**

Nach der RNA-Interferenz gegen die Galectine, die zu einer starken Reduzierung der Zellzahl führen, sind die embryonalen Zellen am Ende der Entwicklung unterschiedlich groß und in den größeren Zellen befinden sich auch offensichtlich größere Zellkerne. 4D-mikroskopische Auswertungen zeigen, dass in den Embryonen der Mechanismus der Zytokinese gestört ist. Am Ende der Zellteilung können nicht zwei neue Zellen gebildet werden, sondern es kommt zur Fusion der beiden sich bildenden Tochterzellen (Abb. 29), sodass sich die replizierte DNA in einer Zelle wieder findet.



**Abb. 29:** Mitosen in einem Embryo nach RNAi gegen LEC-3. (A) Zellen vor der Mitose, weißer und schwarzer Pfeil. (B) Auflösen der Kernmembran (weißer Pfeil), Zelle vor der Mitose (schwarzer Pfeil). (C) Die Teilungsfurche bildet sich (weißer Pfeil), die Kernmembran löst sich auf (schwarzer Pfeil). (D) In beiden Zellen beginnt sich der kontraktile Ring zu schließen. (E) Die Zytokinese (schwarzer Pfeil) kann in der größeren Zelle nicht stattfinden, weil sich die Teilungsfurche nicht richtig ausbildet (weißer Pfeil). (F) Die Zytokinese ist abgeschlossen (schwarzer Pfeil) während sich in der größeren mitotischen Zelle die Teilungsfurche nicht vertieft. (G) bis (I) (schwarze Pfeile) Es sind zwei neue Zellen entstanden, (G) (weiße Pfeile) die Teilungsfurche bildet sich nicht aus, (H) die Zytokinese findet nicht statt, (I) es ist eine große polynukleäre Zelle entstanden.

Je früher diese zufälligen Zellfusionen eintreten, desto größer bleibt die polynukleäre Zelle. Die Galectine haben scheinbar eine direkte Funktion bei der Mechanik der Zellteilung. Die Mitose ist ein äußerst komplexer Prozess, bei dem nicht nur der Spindelapparat nach der Replikation die beiden Chromosomensätze voneinander trennt und der Zusammenschluss des kontraktilen Ringes den Zellkörper einschnürt. Gleichzeitig werden die <focal adhesions> in der G<sub>2</sub>/M Phase aufgehoben, damit sich die mitotische Zelle aus dem zellulären Verband lösen und abrunden kann. Dies geschieht z.B. durch die Phosphorylierung der Zelladhäsion vermittelnden Proteine  $\beta$ -Integrin und Paxillin (Yamaguchi *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 2003). Zusätzlich wird der Zellkortex insbesondere innerhalb der Teilungsfurche komplett umstrukturiert, um ein membranständiges Adhäsions-, Proteinverteilungs- und Signalisierungssystem zu etablieren, das zur Koordination aller an der Zytokinese beteiligten Prozesse benötigt wird (Hickson *et al.* 2006).

Die eben beschriebene Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen an der Zellteilung lässt eine Beteiligung der Galectine als Mediatoren der Zelladhäsion an diesem Prozess plausibel erscheinen. Dass die hier gezeigte Funktion der Galectine in der Zytokinese eine Störung der Zelladhäsion verursacht setzt voraus, dass sie an der Zellmembran innerhalb der Teilungsfurche lokalisiert sind. Dies wurde mit neuen polyklonalen Antikörpern überprüft.

### Galectine lokalisieren in der Teilungsfurche

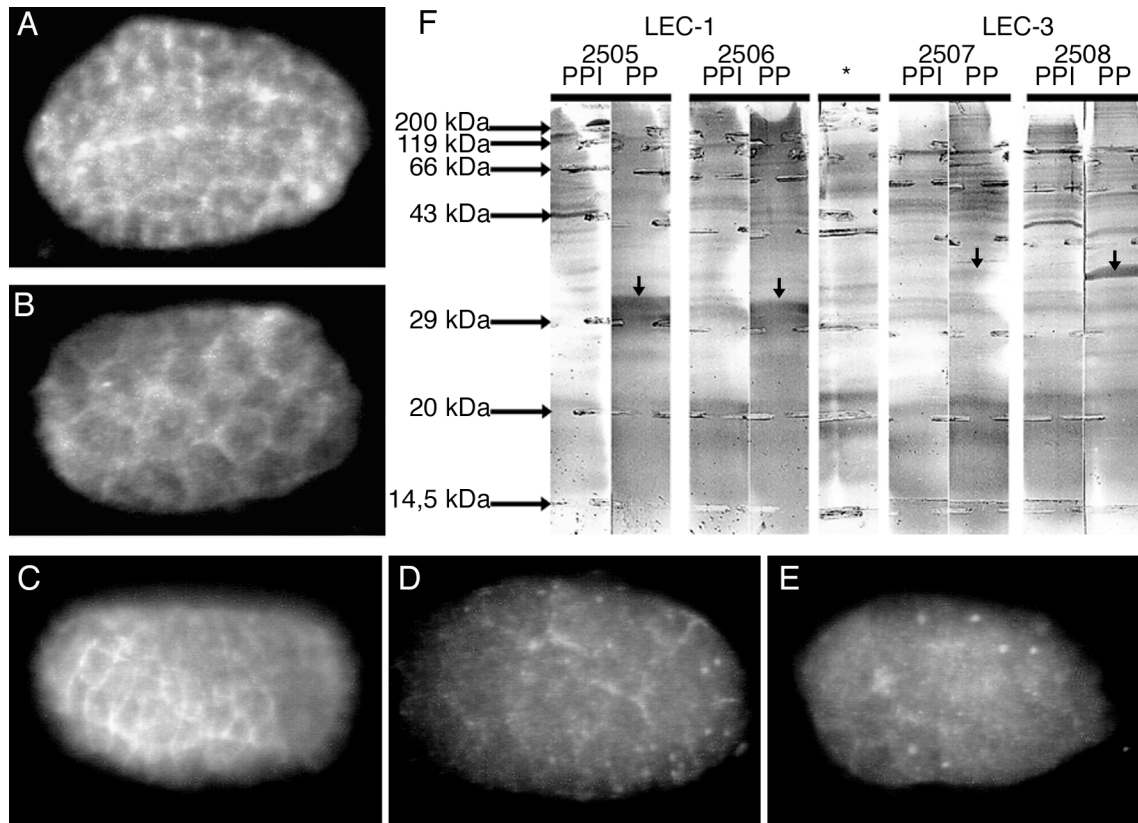
Da *lec-3* und *lec-1* in den RNAi-Experimenten einen Proliferationsarrest hervorrufen, wurden gegen diese Galectine Antikörper hergestellt.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen die Proteine LEC-1 und LEC-3 wurden jeweils zwei Kaninchen mit einem Peptid aus LEC-1 bzw. LEC-3 immunisiert (Tab. 14) und die Spezifität der Antikörper gegen LEC-1 und LEC-3 wurde mit verdünntem Serum der zweiten Blutung im Western Blot nachgewiesen (Abb. 30F).

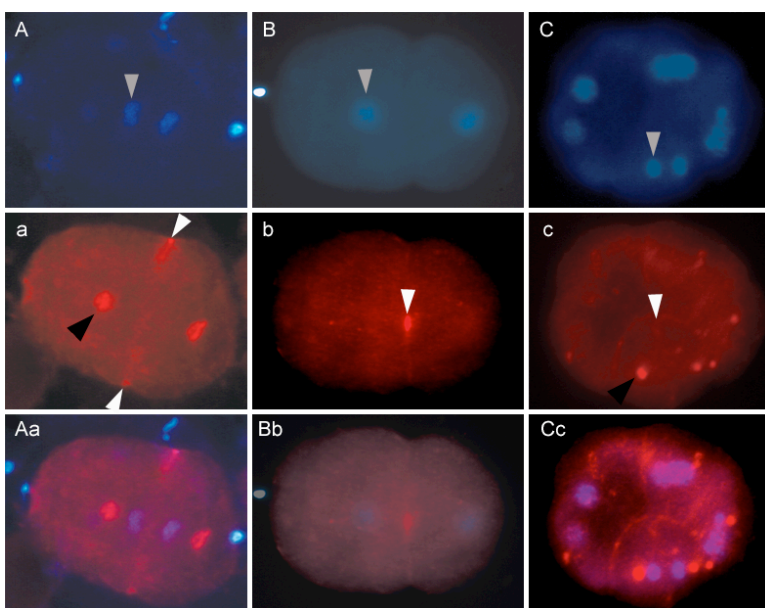
**Tab. 14:** Die Antigene, verwendeten Peptide und Referenzdaten der Immunisierungen von Kaninchen gegen LEC-1 und LEC-3 (AS = Aminosäure).

Antigen	Offenes Leseraster	Peptid (Position im Protein)	Referenz Code	Antigencode	Kaninchen Nr.
LEC-1	W09H1.6a	-MSAEEP KSYVPY- (AS 1-14)	ZDE06074	EPO60943-KLH-MBS	2505, 2506
LEC-3	ZK892.1c	-CAKPTG VGSFV- (AS 210-221)	ZDE06075	EPO60944-KLH-MBS	2507, 2508

Während den Zellteilungen färbt der polyklonale Antikörper gegen LEC-1 die Zellmembran in der Teilungsfurche, was für eine Zelladhäsion vermittelnde Funktion dieser beiden Proteine während der Zellteilung spricht (Abb. 31 und 32). Die Antikörper färben auch die Zentriolen, die in *C. elegans* jedoch sehr oft unspezifisch von Antikörpern gebunden werden (Ralf Schnabel, Carrie Cowan, pers. Mitteilung). Antikörperfärbungen mit Embryonen, in denen mit einer RNA-Interferenz das LEC-1-Protein stark reduziert wurde, zeigen eine starke Reduktion der Membranfärbung im Vergleich zu einer gleich intensiven Färbung der Zentriolen wie in normalen Embryonen (Abb. 30). Die Erkennung der Zentriolen durch die polyklonalen Antikörper gegen LEC-1 ist also unspezifisch.

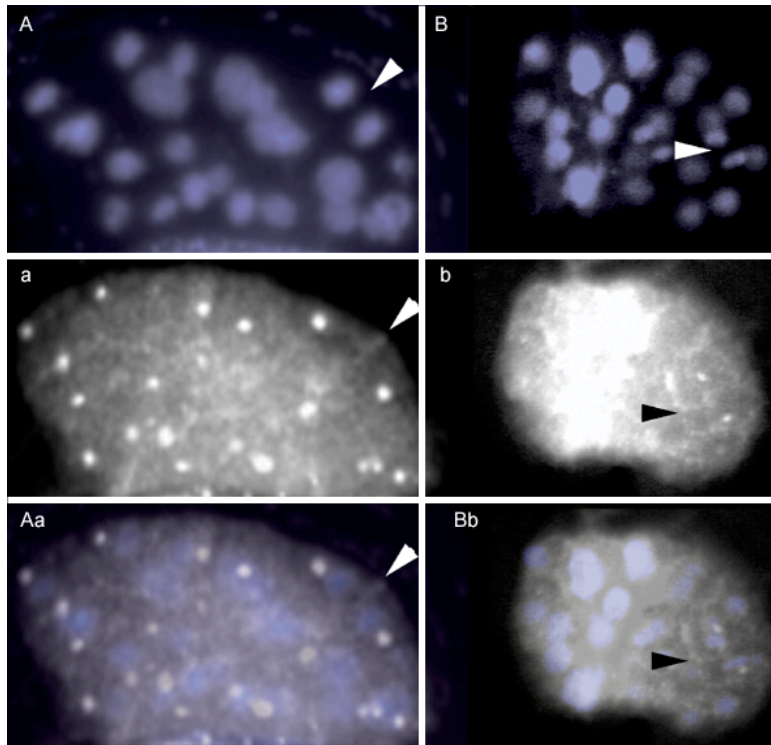


**Abb. 30:** Spezifitätskontrollen der polyklonalen Antikörper gegen LEC-1 und LEC-3. (A) und (B) Serum von zweiter Blutung aus Immunisierung gegen LEC-1. (C) bis (E) Serum von erster Blutung aus Immunisierung gegen LEC-1. (C) Wildtyp-Kontrolle (D) und (E) Embryonen aus RNAi-Experimenten gegen LEC-1. (F) Western Blots mit den Seren der zweiten Blutung aus beiden Immunisierungen gegen Wildtyp-Proteinextrakt. 2505-2508 Nummern der immunisierten Kaninchen, \* = nur sekundärer Antikörper, PPI = Präimmunserum, PP = Serum des immunisierten Kaninchens, jeweils 1:5000 im PBST, sekundärer Antikörper Ziege gegen Kaninchen (HRP-gekoppelt) 1:1500 in PBST.



**Abb. 31:** Doppelfärbungen mit DAPI und polyklonalen Antikörpern gegen LEC-1 in frühen Wildtyp Embryonen. (A) bis (C) DAPI 20  $\mu\text{g/ml}$ , (a) bis (c) primärer polyklonaler Antikörper, immunisiertes Serum 2506 1 : 500 in TBST, sekundärer Antikörper Ziege gegen Kaninchen 1 : 250 in TBST, Cyber 3-gekoppelt, (Aa) bis (Cc) Überlagerung. LEC-1 lokalisiert in mitotischen Zellen in der Teilungsfurche.





**Abb. 32:** Doppelfärbungen mit DAPI und polyklonalen Antikörpern gegen LEC-1 in frühen Wildtyp Embryonen. (A) und (B) DAPI 20  $\mu\text{g/ml}$ , (a) und (b) primärer polyklonaler Antikörper, immunisiertes Serum 2506 1 : 500 in TBST, sekundärer Antikörper Ziege gegen Kaninchen 1 : 250 in TBST, Cyber 3-gekoppelt, (Aa) und (Bb) Überlagerung. LEC-1 lokalisiert in mitotischen Zellen in der Teilungsfurche.

Der zuerst entdeckte drastische Phänotyp einer arretierten Zellproliferation, der ursprünglich als dem *sud-1* Phänotyp entgegengesetzt eingestuft wurde, beruht wie hier gezeigt, auf einem direkten Defekt der Mechanik der Zellteilung. In *sud-1* Embryonen finden zu viele Zellteilungen statt, die sicher auf eine Entgleisung der Zellzykluskontrolle zurück zu führen sind, was nichts mit der Störung der Zytokinese zu tun hat. Die formale Einstufung der Galectin Phänotypen als *sud-1* entgegengesetzte Phänotypen ist somit nicht richtig. In diesem Fall üben die Galectine eine Funktion aus, die mit dem *sud-1* Phänotyp nichts zu tun hat.

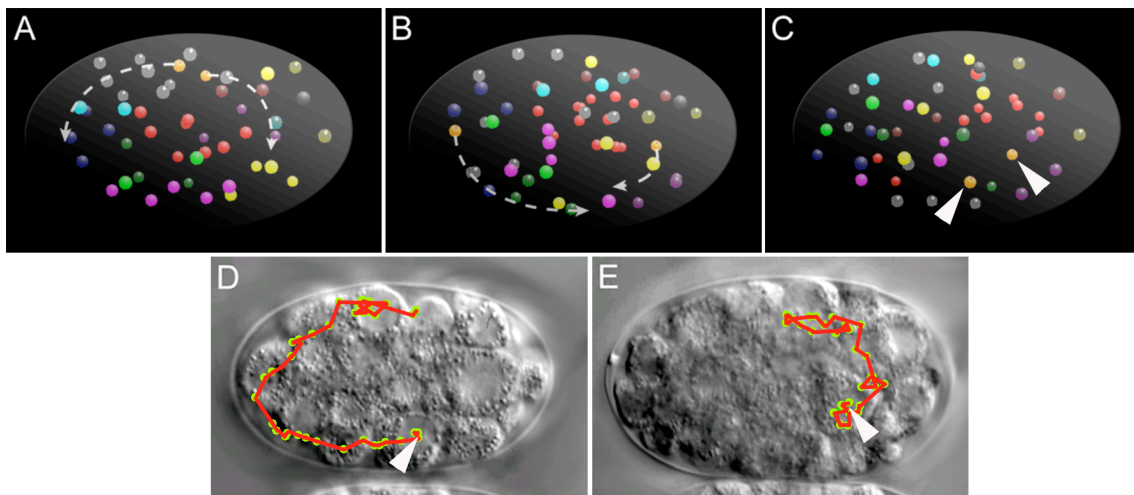
Wie noch diskutiert werden wird, ist dies möglicherweise der erste experimentelle Nachweis, dass Galectine an der Stabilisierung der Zellmembrankontakte in der Zellteilungsfurche beteiligt sind.

### Einfluss der Galectine auf die Zellmobilität

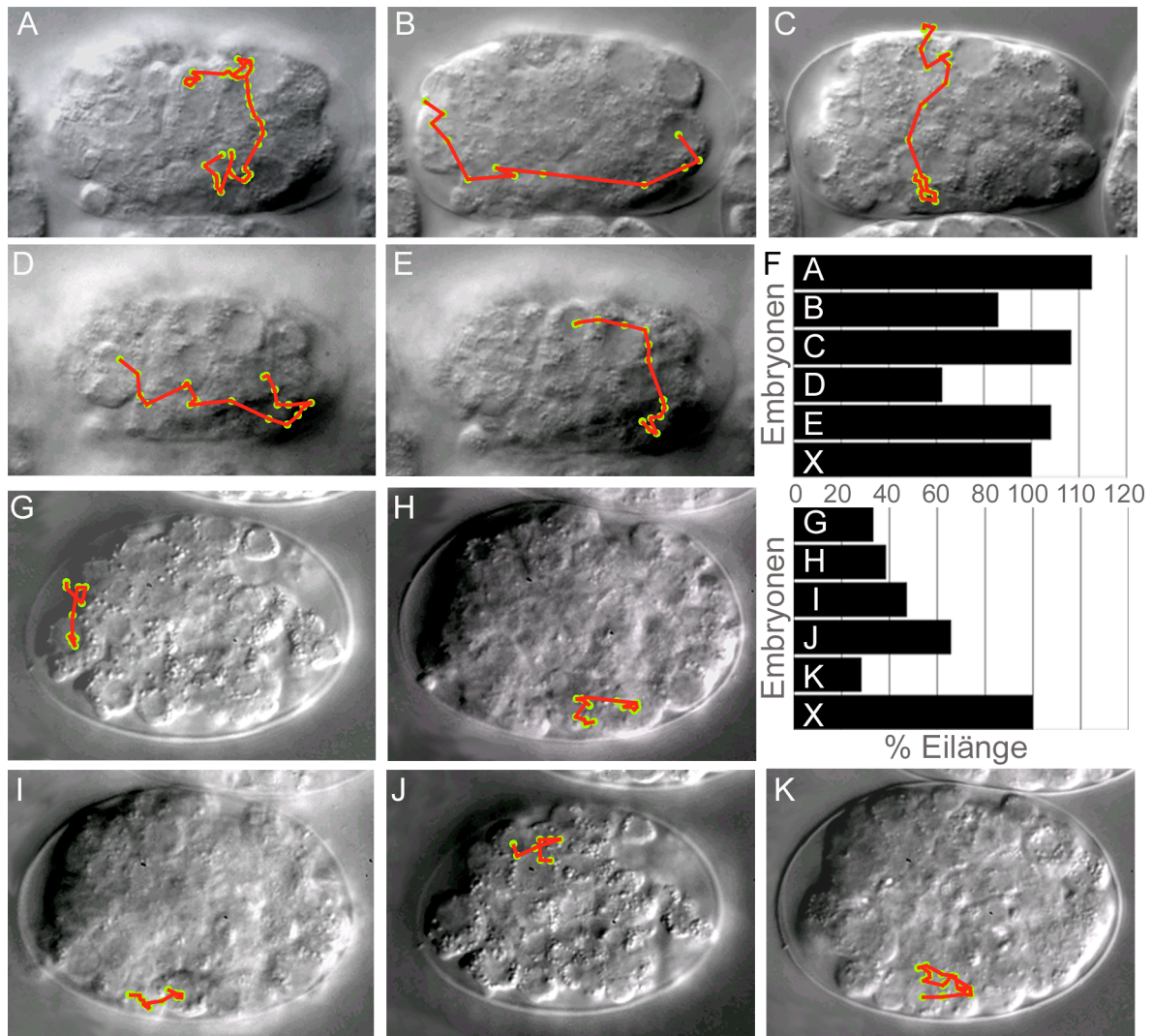
Die Entdeckung des zweiten Phänotyps nach RNA-Interferenz gegen Galectine ist einem glücklichen Umstand und der benutzten Technik der 4D-Mikroskopie zu verdanken. Ich habe einige Zellen, obwohl sie sich nicht weiter teilten, noch über einige Stunden der Entwicklung weiter verfolgt. Beim Abspielen der 3D-Repräsentationen über die Zeit ist mir dann aufgefallen, dass einige Zellen praktisch einmal ganz um das 50-Zell-Embryo herumwandern (Abb. 33). Dies erschien mir ein außergewöhnliches Verhalten, das auch Ralf Schnabel, der schon tausende von Embryonen analysiert hat, noch nie aufgefallen war. Wie im Folgenden ausgeführt, war diese Beobachtung Grundlage für eine sorgfältige Analyse der Funktion von Galectinen bei den Zellbewegungen im Embryo.

Besonders auffällig war eine erhöhte Bewegung der arretierten Zellen bei der RNA-Interferenz gegen das Galectin LEC-3 (Abb. 34). Die Zellen wandern im Durchschnitt 87 % der Eilänge (Tab. 15). Die interessante Frage, ob diese Beweglichkeit von SUD-1 abhängig ist, das ja physikalisch mit den Galectinen interagiert, wurde durch die RNA-Interferenz in der *sud-1* Mutante (*t1242*) untersucht. Die Zellen wandern dann im Durchschnitt nur noch 54 % der Eilänge, was ein direkter Hinweis darauf ist, dass die Zellbeweglichkeit von SUD-1 abhängt (Tab. 15, Abb. 35). Es ergab sich jedoch das Problem, ob in den Galectin-Embryonen die erhöht scheinende Migration durch die Abwesenheit von SUD-1 nur wieder auf den normalen Basalwert reduziert wird, oder ob SUD-1 *per se* für die Migration gebraucht wird. Dazu war es notwendig zu bestimmen, wie weit Zellen in einem normalen Embryo migrieren, das wie die Galectin-Embryonen mit 50-100 Zellen arretiert. Um diesen Wert zu bestimmen, war eine Manipulation nötig, durch die normale Embryonen im 50-100-Zell-Stadium arretieren. Dazu bot sich die temperatursensitive Mutante *t1099* an, bei der wie schon beschrieben die Zellproliferation ebenfalls mit 50-100 Zellen arretiert. In diesen Embryonen wandern die Zellen 63 % der Eilänge (Tab. 15, Abb. 35). Ein Problem ist, dass die genaue Funktion des Gens *t1099* nicht bekannt ist und damit nicht stringent ausgeschlossen werden kann, dass es auch eine Funktion in der Zellbewegung hat. In der Doppelmutante (*t1115,t1099*) migrieren die Zellen 60 % Eilänge. Wenn ich annehme, dass der Wert aus *t1099*-Embryonen die normale Beweglichkeit der Zellen reflektiert, kann der Galectinwert so interpretiert werden, dass die Galectine normalerweise die Zellbewegung inhibieren. Die Abwesenheit von SUD-1 alleine hat keine Wirkung auf die Beweglichkeit *per se*. Wird jedoch LEC-3 und SUD-1 inhibiert, fällt die Beweglichkeit der Zellen auf den normalen Wert zurück. (Tab. 15, Abb. 35). Dieses Ergebnis ist formal so zu interpretieren, dass die Inhibition der Zellbewegung durch die Galectine direkt von dem Kontakt der beiden Moleküle abhängt.

Die Identifizierung von mehreren Galectinen im Yeast-Two-Hybrid wirft nun die Frage auf, ob der beobachtete Effekt durch die Inaktivierung von mehreren Galectinen gleichzeitig noch verstärkt wird. Dies konnte bestätigt werden, denn bei der Inaktivierung der Galectine LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4 in *sud-1* Embryonen bewegen sich die Zellen nur noch 34 % der Eilänge (Tab. 16, Abb. 36), was eine signifikante Reduzierung der Beweglichkeit im Vergleich zu den 54 % in *sud-1* Embryonen mit RNAi gegen LEC-3 ist. Die RNA-Interferenz von LEC-1-4 im Wildtyp führt zu einer Bewegung der Zellen von durchschnittlich 84 % der Eilänge. Dies ist im Vergleich zum RNAi gegen LEC-3 im Wildtyp (87 %) eine weniger starke Reduzierung. Warum die Beweglichkeit bei der gleichzeitigen Inaktivierung von Galectinen und SUD-1 nicht wieder auf den normalen Wert, sondern weiter reduziert wird, ist im Moment nicht zu erklären, da es bei einer Abwesenheit von SUD-1 nicht wichtig sein sollte, wie viele Galectine potentiell noch binden könnten.



**Abb. 33:** RNAi-Experiment gegen die Galectin-Kombination LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4 in Wildtyp. (A) bis (C) 3D-Repräsentationen eines Embryos nach Injektion eines dsRNA Gemisches der Galectine LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4. Kugeln gleicher Farbe stellen Zellen identischer Vorläufer dar. Die besonders stark erhöhte Mobilität zweier Zellen (orange) in drei aufeinander folgenden Zeitpunkten ist mit gestrichelten Pfeilen schematisch dargestellt. (D) und (E) Nomarskiaufnahmen des gleichen Embryos nach dem Proliferationsstop. Die Wegstrecke der beiden in (A) bis (C) orange markierten Zellen ist mit der SIMI®BioCell Software als rot-grüne Linie markiert. Anterior links, posterior rechts. Es ist zu sehen, wie die eine Zelle scheinbar gezielt um das anteriore Ende des Embryos herum wandert, und die andere Zelle scheinbar gezielt um das posteriore Ende des Embryos herum wandert. Die beiden Zellen wandern jeweils die größte mögliche Distanz durch das Embryo, um sich auf der gegenüber liegenden Seite wieder zu treffen.

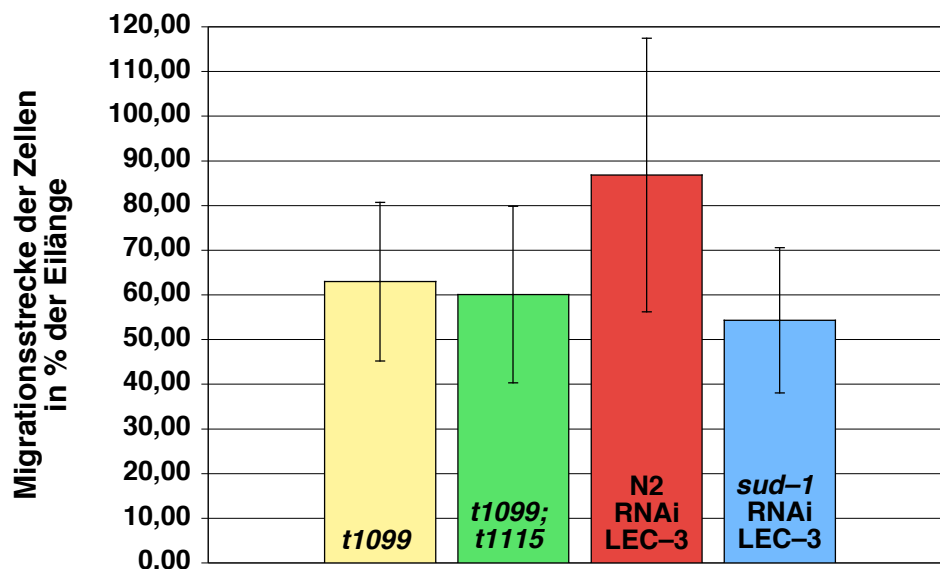


**Abb. 34:** Vergleich der Mobilität embryonaler Blastomeren nach RNA-Interferenz gegen die Galectinmischung LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4 in Wildtyp Embryonen (A bis E), und *sud-1* mutanten Embryonen (G) bis (K). Anterior jeweils links und posterior rechts. Die Wegstrecken einiger zur Berechnung verwendeten Zellen sind nach der letzten Mitose mit der Software SIMI®BioCell als rot-grüne Linie markiert. (F) Die Weite der in den Nomarskiaufern markierten Strecken sind als Prozent der Eilänge in Anterior-posterior-Ausdehnung dargestellt. (X) ist die durchschnittliche Eilänge des jeweiligen Embryos (X=100%). Die Zellmobilität ist in den *sud-1* Embryonen signifikant reduziert, vgl. Tab. 16.



**Tab. 15:** t-Test mit den %-Werten der Wegstrecken nach der RNA-Interferenz gegen LEC-3.

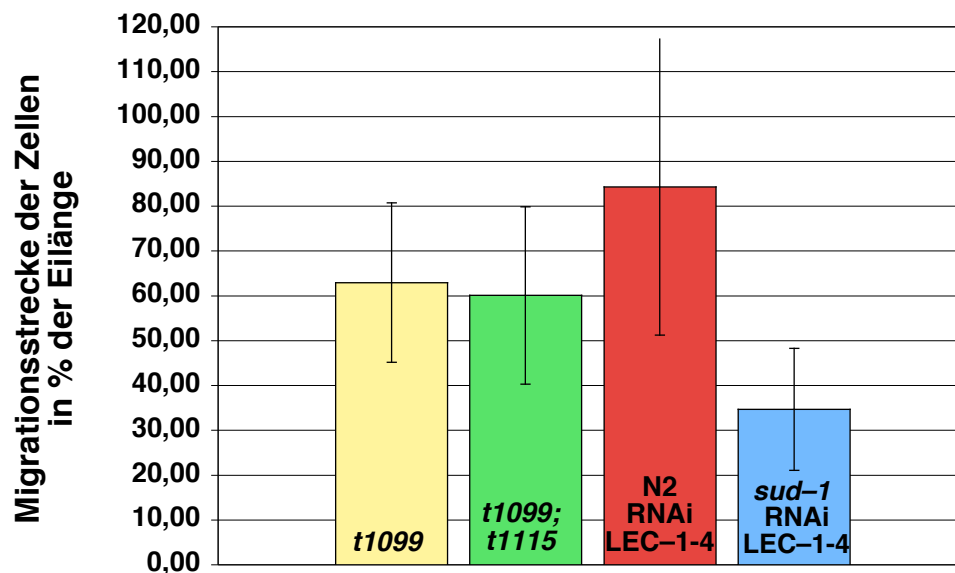
	1) <i>t1099</i>		2) <i>t1099;t1115</i>		3) N2 RNAi LEC-3		4) <i>sud-1</i> RNAi LEC-3	
gemessene Werte	67,03	68,59	43,88	65,01	57,20	54,80	62,32	87,43
	62,45	78,17	38,98	37,99	48,92	68,97	32,45	84,84
	70,35	100,94	61,05	88,29	88,84	141,18	51,98	33,00
	74,28	89,04	65,21	57,54	44,54	92,14	68,64	55,75
	60,31	43,22	48,79	105,42	93,71	106,15	54,85	61,25
	44,26	45,55	58,20	66,44	76,43	107,23	44,42	45,75
	36,24	64,71	56,88	38,00	55,62	73,82	32,43	63,25
	37,79	69,37	93,78	42,66	118,32	142,52	45,36	42,75
	57,98		53,15		105,78		56,87	
Mittelwert	62,96		60,07		86,83		54,31	
Standard- abweichung	17,77		19,78		30,59		16,27	
Anzahl	17		17		17		17	
Varianz	297,13		368,27		880,85		249,19	
t-Wert	1)-2): 0,45	1)-3): 2,78	1)-4): 1,48	2)-3): 3,03	2)-4): 0,93	3)-4): 3,87		
p-Wert	p > 0,7	p < 0,02	p < 0,2	p < 0,01	p < 0,4	p < 0,005		



**Abb. 35:** Die Mobilität der Zellen in Wildtyp und *sud-1* mutierten Embryonen nach RNA-Interferenz gegen LEC-3. Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Wegstrecken. Es ist zu erkennen, dass durch die RNA-Interferenz gegen LEC-3 im Wildtyp die Zellmobilität stark erhöht ist.

**Tab. 16:** t-Test mit den %-Werten der Wegstrecken nach der RNA-Interferenz gegen LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4.

	1) <i>t1099</i>		2) <i>t1099;t1115</i>		3) N2 RNAi LEC-1-4		4) <i>sud-1</i> RNAi LEC-1-4	
gemessene Werte	67,03	68,59	43,88	65,01	125,47	153,77	28,23	17,29
	62,45	78,17	38,98	37,99	86,08	42,28	65,69	23,47
	70,35	100,94	61,05	88,29	116,74	132,23	47,22	54,76
	74,28	89,04	65,21	57,54	62,50	39,33	38,00	33,18
	60,31	43,22	48,79	105,42	108,25	76,44	33,24	36,69
	44,26	45,55	58,20	66,44	84,18	88,24	39,89	51,25
	36,24	64,71	56,88	38,00	71,29	50,14	23,14	26,17
	37,79	69,37	93,78	42,66	77,62	57,27	21,81	18,34
	57,98		53,15		61,07		31,65	
Mittelwert	62,96		60,07		84,29		34,71	
Standard- abweichung	17,77		19,78		33,02		13,60	
Anzahl	17		17		17		17	
Varianz	297,13		368,27		1025,89		174,15	
t-Wert	1)-2): 0,45	1)-3): 2,35	1)-4): 5,21	2)-3): 2,59	2)-4): 4,36	3)-4): 5,73		
p-Wert	p > 0,7	p < 0,02	p < 0,2	p < 0,01	p < 0,4	p < 0,005		



**Abb. 36:** Die Mobilität der Zellen in Wildtyp und *sud-1* mutierten Embryonen nach RNA-Interferenz gegen LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4. Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Wegstrecken. Es ist zu erkennen, dass durch die RNA-Interferenz gegen LEC-1+LEC-2+LEC-3+LEC-4 im Wildtyp die Zellmobilität stark erhöht ist.

## Einfluss der Galectine auf die Zellsortierung

Bei den bisher durchgeführten RNAi-Experimenten haben die Zellen nur 50-100 Zellen gebildet. Es konnte zwar untersucht werden, ob sich die Zellen mehr oder weniger bewegen, bezüglich der terminalen Position existieren jedoch keine Referenzdaten, weil die Zellen im Wildtyp in diesem Stadium der Proliferation noch keine definierten Positionen anlaufen. Falls die aus dem terminalen Phänotyp der *sud-1* Embryonen abgeleitete Hypothese, dass SUD-1 an der Zellführung beteiligt ist, korrekt ist und dabei die Galectine, wie zuletzt gezeigt, interagieren, müsste es möglich sein, durch die RNA-Interferenz gegen Galectine einen *sud-1* Phänotyp oder zumindest Aspekte des *sud-1* Phänotyps hervorzurufen.

Ich habe zwei Galectin-Kombinationen gefunden (*lec-1+lec-2* und *lec-1+lec-2+lec-4*), deren transiente Unterdrückung durch RNA-Interferenz einen *sud-1* ähnlichen Phänotyp in Wildtyp Embryonen verursachen. Interessanterweise führte die Kombination eines essentiellen Galectins (*lec-1*) mit den nicht essentiellen Galectinen (*lec-2* und *lec-4*) letztlich zu dem gleichen Phänotyp wie *sud-1* (Abb. 37). Eine mögliche Erklärung ist, dass manche Galectine überlappende (redundante) Funktionen ausüben, und deshalb die RNA-Interferenz einzelner Galectine keine Auswirkung auf die Embryogenese hat. *sud-1* kann mehrere Galectine binden, da mehrere Galectine im Y2H und im Pulldown-Experiment gefunden wurden. Interessanterweise ist das am häufigsten gefundene LEC-2 nötig, um den *sud-1* Phänotyp zu erzeugen. Die Abbildung 37 zeigt, dass die Kombination *lec-1+lec-2* einen schwächeren Phänotyp hat als die Kombination *lec-1+lec-2+lec-4*. Bei beiden Kombinationen ist die Zellführung gestört. Je mehr Galectine inhibiert werden, um so schlechter wird sortiert. Dies ist im Einklang mit meiner gerade aufgestellten Hypothese.

Nicht nur die Migration der Zellen wird durch die RNA-Interferenz gegen LEC-1+LEC-2+LEC-4 bzw. gegen LEC-1+LEC-2 gestört. Wie bei *sud-1* tritt auch hier eine exzessive Proliferation der Zellen auf (Tab. 17) und die Zellschicksale sind abnormal. Die bioinformatisch berechneten globalen Migrationswerte weichen nicht signifikant von denen im Wildtyp oder in der *sud-1* Mutante ab (Tab. 18). Diese Ähnlichkeit mit dem *sud-1* Phänotyp ist wiederum eine starke Evidenz für die Interaktion der Galectine mit SUD-1. In diesem Stadium meiner Arbeiten ist eine neue Bioinformatische Evidenz aufgetaucht, dass SUD-1 sich selbst als "Galectin" qualifiziert (siehe Box: Exkurs).

**Tab. 17:** Detaillierte Zelllinien-Analyse von Embryonen in RNAi-Experimenten gegen die Kombinationen LEC-1+LEC-2 und LEC-1+LEC-2+LEC-4. Kopf: Zum Zeitpunkt mit 32-AB-Nachkommen nach der neunten Teilungsrunde sind die typischen Positionen der Apoptosen aller acht AB-Zelllinien in eine Zelllinie projiziert (Sterne). Erste Zeile der Tabelle: die AB-Spezifikation der jeweiligen apoptotischen Zelle, zweite Zeile: der ausführliche Name der apoptotischen Zelle (xxx steht für die AB-Spezifikation der apoptotischen Zelle, z.B. ala). Linke Spalte der Tabelle: die untersuchten Embryonen nach den jeweiligen RNAi-Experimenten und ihre AB-Zelllinien. Die Zahlen geben an, wie viele Zellen aus der Zelle hervorgehen, die in der zweiten Zeile genannten ist (0 = Apoptose, 1 = Interphase oder Mitose+Apoptose, 2 = Mitose, 3 = zwei Mitosen). Bei Schicksalstransformationen sollten die Zahlen zweier Zeilen identisch sein. Die Zellen wurden bis zum Ende der Proliferation (Wildtyp) bzw. bis nach der 9. Teilungsrunde (RNAi-Experimente) analysiert. Blau: es entstehen mehr Zellen als im Wildtyp, rot: es entstehen weniger Zellen als im Wildtyp. Die Zahl in den Klammern gibt an, wie viele Zellen mehr oder weniger im Vergleich zum Wildtyp entstehen.

frühe AB-Zelltode		ara arp	ala	ala	plp	alp	plp prp	alp	ala	ala	plp prp
		xxxaaaapp	xxxapapa	xxxappaa	xxxappap	xxxpaaaa	xxxpaaap	xxxpaapa	xxxpapaa	xxxppaaa	xxxppapp
Wildtyp	ala	1	0	0	2	1	2	1	0	0	2
	alp	1	2	1	2	0	2	0	2	2	1
	ara	0	2	2	2	2	1	1	1	1	2
	arp	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	pla	1	2	1	1	2	3	1	2	1	1
	plp	2	2	2	0	2	0	1	3	2	0
	pra	1	2	1	1	2	3	1	2	1	1
	prp	2	2	2	2	2	0	1	3	2	0
lec-1,2,4-AL	ala	1	1 (+1)	2 (+2)	2	2 (+1)	2				
	alp	1	2	2 (+1)	2	1 (+1)		1 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	1
	ara	2 (+2)	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	2	2 (+1)	1	2 (+1)	2 (+1)	1 (-1)
	arp	2 (+1)	2 (+1)	1	1	1	1	1	1	1	1 (-1)
	pla	2 (+1)	2	2 (+1)	1				2	1	1
	plp	1 (-1)	2	2	1 (+1)	2	2 (+2)	1	1 (-2)	1 (-1)	1 (+1)
	pra	2 (+1)	2	2 (+1)	1	2	1 (-2)	1	2	2 (+1)	
	prp	2	2	1 (-1)	1 (-1)	2	2 (+2)		2		2 (+2)
MM_lec-1,2,4D_Mitte	ala	1	1 (+1)	1 (+1)	1 (-1)	1	1 (-1)	1			1 (-1)
	alp	1	1 (-1)	1	1 (-1)	1 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	1
	ara		1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	1	1	1	1	1 (-1)
	arp	2 (+2)	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	2 (+1)	1	2 (+1)	2
	pla	1	1 (-1)			1 (-1)	1 (-2)	2 (+1)	1	1	1
	plp	1 (-1)		0 (-2)	1 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	1	1 (-2)	1	1
	pra	1				1 (-1)	1 (-2)	1	1 (-1)	1	1
	prp									1	1
MM_lec-1,2DL	ala	1	1 (+1)	1 (+1)	2	1	1 (-1)	1	2 (+2)	0	1 (-1)
	alp	2 (+1)	1 (-1)			1	1	1	1	2	2 (+1)
	ara	2 (+2)	2	2	1 (-1)	1 (-1)			2 (+1)	1	
	arp	2 (+2)	1	1	1	1	1	1	1	2 (+1)	2
	pla										
	plp										
	pra										
	prp	1 (-1)	1 (-1)		2	2	2 (-1)	1 (+1)			2 (+1)

**Tab. 18:** Vergleich der Migrationswege embryonaler Zellen in Wildtyp, *sud-1* Embryonen und Embryonen nach RNA-Interferenz gegen LEC-1 + LEC-2 und gegen LEC-1 + LEC-2 + LEC-4. Die Einheit ist Eilänge.

Embryo	$\Sigma$ Migrationen	$\Sigma$ Luftlinien	$\Sigma$ Mitosedistanzen	RMS vs. Wildtyp #5	RMS vs. <i>sud-1</i> #1
Wildtyp #1	170	56	27	0,05	0,187
Wildtyp #2	143	50	26	0,06	0,185
Wildtyp #5	168	45	27	0	0,191
<i>sud-1</i> #1	174	40	22	0,191	0
<i>sud-1</i> #2	175	62	25	0,203	0,210
MM_lec1,2,4D_Mitte	152	45	21	0,187	0,175

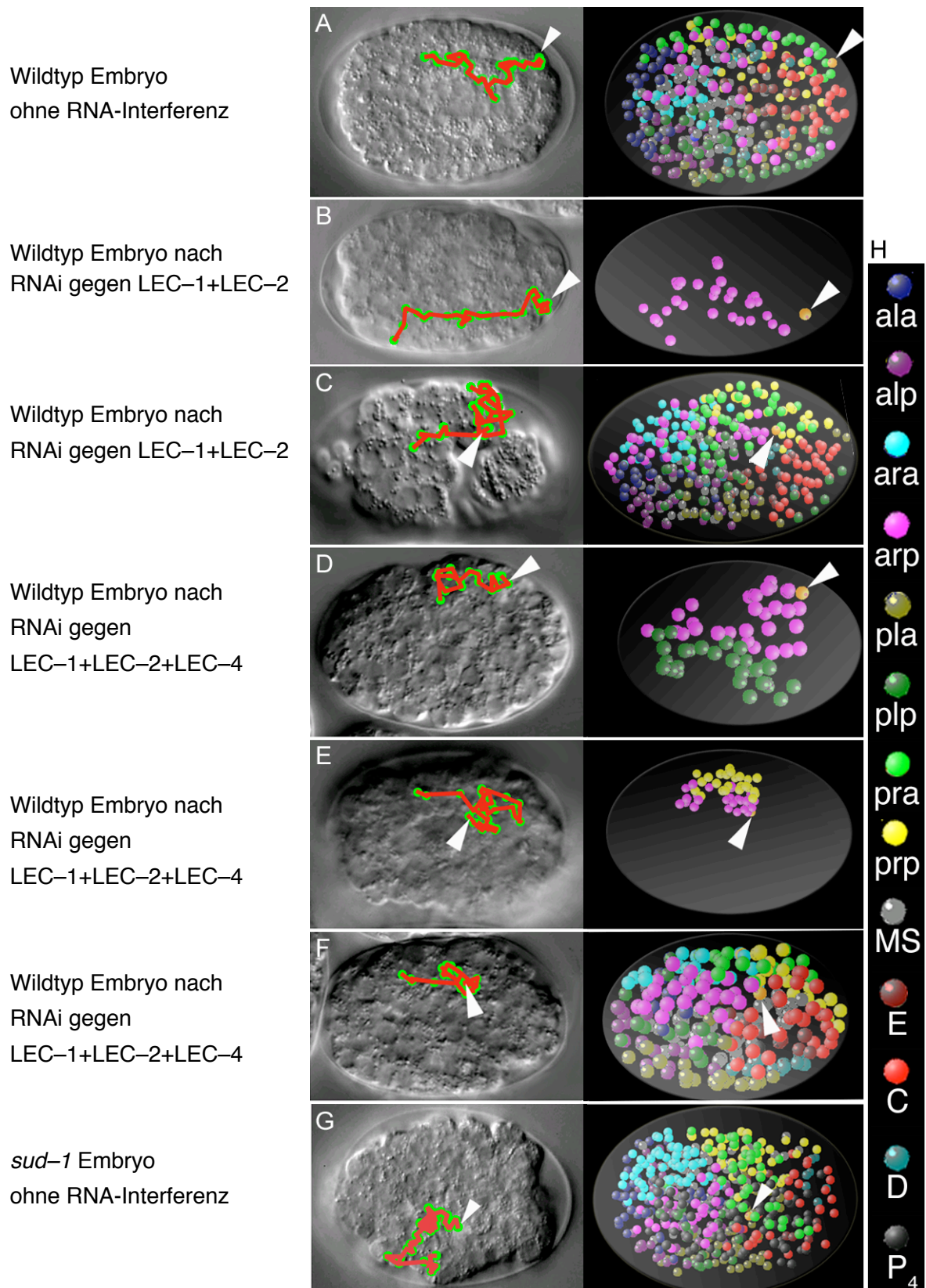
### Exkurs: Strukturelle Homologie von SUD-1 zu einem Zellmigration vermittelnden Lectin

Proteinvergleiche auf der Basis vorhergesagter räumlicher Proteinstrukturen, die im Laufe dieser Arbeit mit Datenbanken von NCBI-Blast ermöglicht wurden, zeigen eine strukturelle Homologie von SUD-1 zu dem Maus-Makrophagen Protein Ym1. Das Ym1-Protein gehört aufgrund seiner Karbohydrat bindenden Domäne zu der Klasse der Lectine und hat Bindungsspezifitäten zu Sacchariden mit freien Aminogruppen, wie N-Glucosamin (GlcN), NGalactosamin (GalN), oder GlcN Polymeren (Chang *et al.* 2001). Bei einer Infektion von Mäusen durch *Trichinella spiralis* sekretiert dieser Nematode einen <mobility inhibitory factor> (MIF), um die Migration der Maus-Makrophagen zu unterdrücken. Die Makrophagen der Mäuse reagieren auf die Präsenz dieses MIF mit einer extremen Verstärkung der Expression des Ym1-Proteins, um die erhöhte Konzentration von MIF auszugleichen und die Mobilität der Makrophagen zu erhalten (Francone *et al.* 2001, Nair *et al.* 2003). Dieser Hinweis auf eine eventuelle Funktion des Gens deckt sich mit der bisher experimentell unterstützten Hypothese, dass die Mutation von *sud-1* letztlich die Zelladhäsion im *C. elegans*-Embryo beeinträchtigt.

#### Abb. 37: (nächste Seite)

Nomarskiaufnahmen und 3D-Repräsentationen von Embryonen nach RNAi gegen Galectin Kombinationen. (A) Wildtyp Embryonen ohne RNA-Interferenz. (B) und (C) Embryonen nach RNAi gegen LEC-1+LEC-2 (D) bis (F) Embryonen nach RNAi gegen LEC-1+LEC-2+LEC-4. (G) *sud-1* Embryo ohne RNA-Interferenz. Die zurückgelegte Strecke der am weitesten posterior liegenden ABarp-Zelle (Pfeilköpfe, orange Kugeln) wurde mit SIMI®BioCell als rot-grüne Linie markiert. Der Vergleich von Wildtyp, RNAi-Experimenten und *sud-1* Embryo verdeutlicht die Ähnlichkeit der Embryos nach den RNA-Interferenzen mit der *sud-1* Mutante. Je mehr Galectine gleichzeitig in ihrer Expression unterdrückt werden, um so weniger werden die Zellen sortiert.

Abb. 37: Legende siehe vorherige Seite.



## Die Zellbewegung hängt von einer spezifischen Zelladhäsionsstärke ab

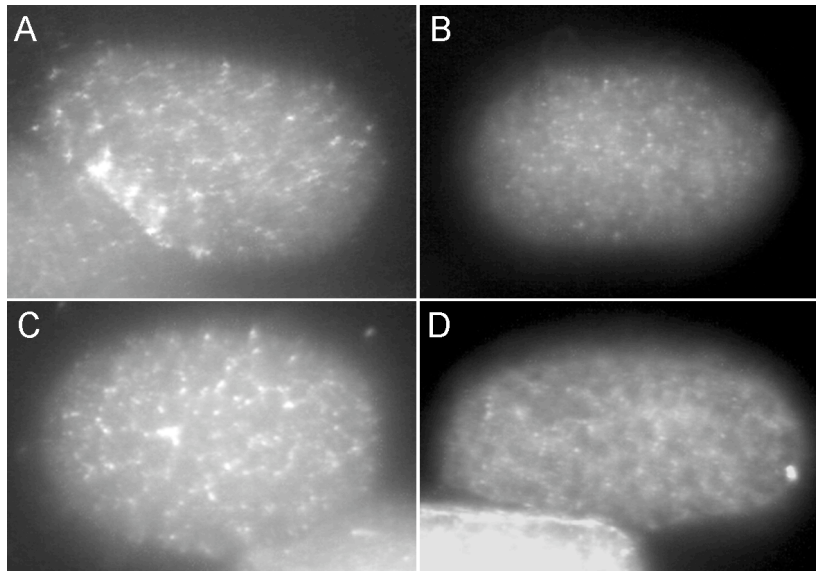
Sowohl SUD-1 als auch die Galectine werden für die Zellmigrationen im *C. elegans* Embryo benötigt. An dieser Stelle ist es vielleicht notwendig zu versuchen, zwei Phänomene zu trennen. Quantitative Modulationen, die die Migration *per se* betreffen und die Führung der Zellen, die für die richtige Position der Zellen notwendig ist. Die Inaktivierung von SUD-1 alleine hat in keinem Experiment zu einer quantitativen Änderung der Migrationen geführt. Im Gegensatz dazu hat die Inhibition von vier Galectinen gleichzeitig, (LEC-1,-2,-3 und -4) oder LEC-3 alleine in den in Abbildung 35 und 36 gezeigten Experimenten die Beweglichkeit der Zellen im Wildtyp erhöht. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine spezifische Adhäsion für eine korrekte Migration notwendig ist. Interessanterweise "normalisiert" die Inhibition von gleichzeitig LEC-3 und SUD-1 die Bewegung quantitativ wieder. Werden weitere Lectine inhibiert, reduziert sich die Fähigkeit der Zellen, sich zu bewegen im Vergleich zur normalen Bewegung. Es scheint also ein kritisches Adhäsionsstärkenfenster zu geben, das für die normale Zellbewegung gebraucht wird. Wegen des Problems, dass die SUD-1- und Galectin-vermittelte Adhäsion möglicherweise auch zur Schicksalsdetermination benötigt wird, kann leider keine strikte Aussage darüber gemacht werden, ob die Moleküle auch direkt an der Richtungsführung der Zellen beteiligt sind. Wie schon beschrieben, sprechen einige Beobachtungen jedoch dafür, dass dies der Fall sein könnte. Als eine zusätzliche Evidenz dafür, dass die Galectine für die Zelladhäsion benötigt werden, wurden mit den schon eingeführten Antikörpern gegen LEC-1 und LEC-3 und dem an dieser Stelle hinzu kommenden Antikörper gegen LEC-2 in Wildtyp Embryonen die Zellmembranen angefärbt.

## LEC-1, LEC-2 und LEC-3 lokalisieren an der Zellmembran

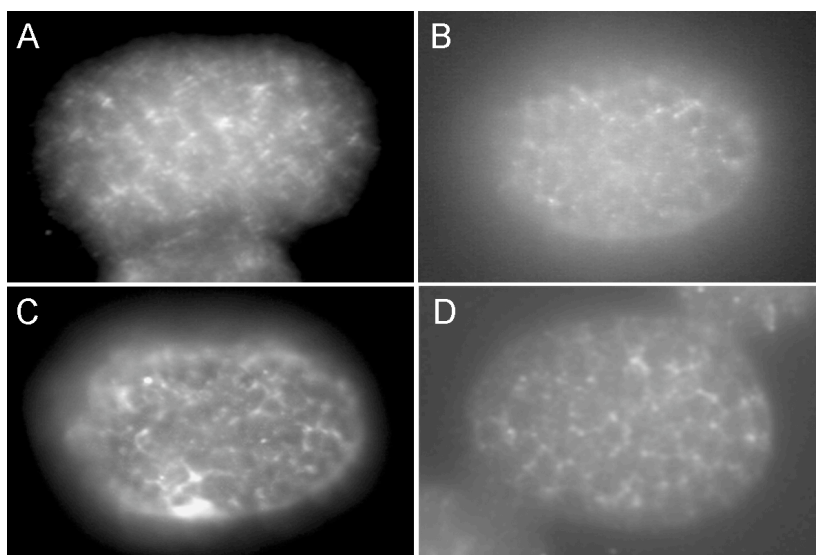
Es wurde oben gezeigt, dass die Galectine die Zellmembranen des Embryos während der Zellteilungen spezifisch färben. Um zu sehen, ob eine generelle Membranassoziation während der Embryogenese, und speziell eine Regulation der Zelladhäsionsstärke durch eine lokal unterschiedlich starke Färbung der Galectine mit Antikörpern sichtbar ist, wurden Immunfluoreszenzen mit den Seren aus der letzten Blutung der Immunisierungen gegen LEC-1 und LEC-3 durchgeführt. Es wurden Wildtyp Embryonen 4D-mikroskopisch aufgenommen, im prämorphogenetischen Stadium auf einem Metallblock in flüssigem Stickstoff schockgefroren, Methanol-Aceton fixiert und zur Antikörperfärbung gegen LEC-1 und LEC-3 verwendet. Ich wollte versuchen, eine differenzierte Expression der Galectine auf Zellmembranen unterschiedlich migrierender Zellen sichtbar zu machen. Dies war leider nicht möglich, eventuell weil die Antikörperfärbung für geringe Abweichungen der Konzentration nicht sensitiv genug ist. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen ruhenden und migrieren-



den Zellen zu erkennen. Die membranassoziierte Lokalisation der Galectine LEC-1 und LEC-3 konnte mit dem Serum der letzten Blutung jedoch bestätigt werden (Abb. 38, 39).



**Abb. 38:** Antikörperfärbungen mit dem Serum aus der letzten Blutung nach Immunisierung gegen LEC-1. (A) Serum 2505 1 : 500 in TBST, (B) Serum 2506 1 : 500 in TBST, (C) Serum 2505 1 : 500 in TBST, (D) Serum 2506 1:1000 in TBST. Jeweils sekundärer Antikörper Ziege gegen Kaninchen, 1:250 in TBST, Cyber 3-gekoppelt.

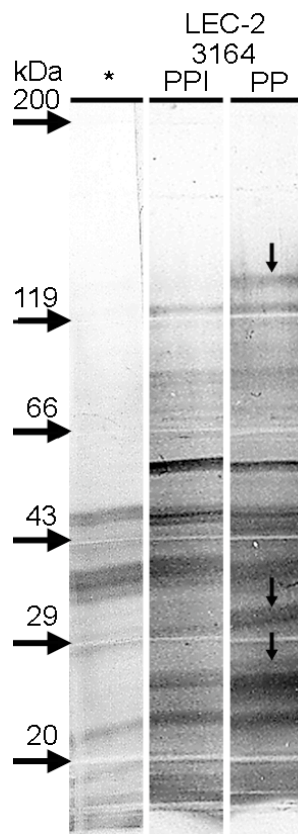


**Abb. 39:** Antikörperfärbungen mit dem Serum aus der letzten Blutung nach Immunisierung gegen LEC-3. (A) Serum 2507 1 : 500 in TBST, (B) Serum 2508 1 : 500 in TBST, (C) Serum 2507 1 : 700 in PBS, (D) Serum 2508 1 : 700 in TBST. Der sekundäre Antikörper ist jeweils Cyber 3-gekoppelt.

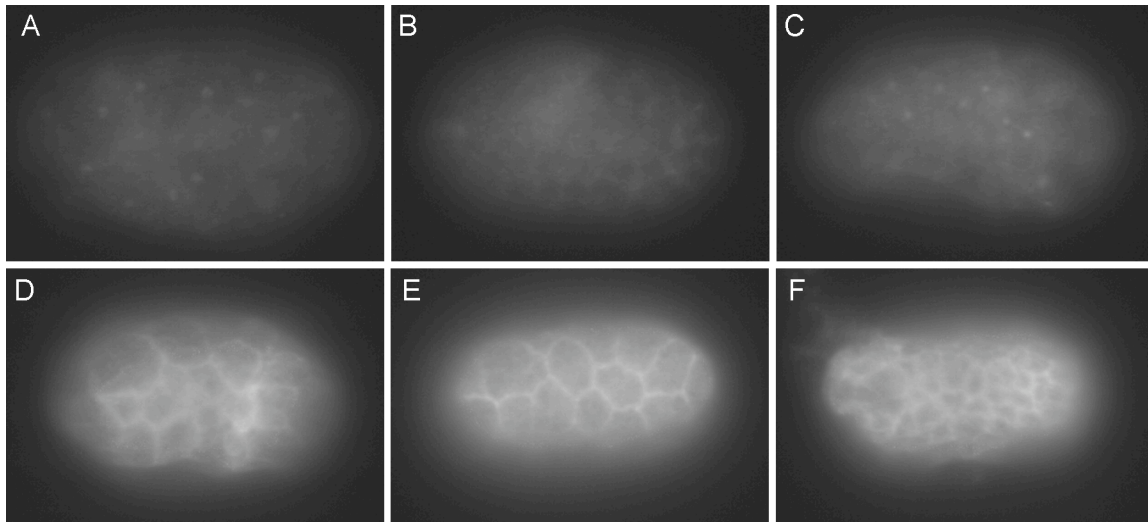
Für polyklonale Antikörper gegen LEC-2 als wichtige Komponente zur Phänotypisierung des *sud-1* Phänotyps wurden zwei Kaninchen mit jeweils zwei Peptiden aus LEC-2 immunisiert (Tab. 19). Die Spezifität des Antikörpers wurde im Western Blot untersucht (Abb. 40), und Immunfluoreszenzen zeigen, dass auch LEC-2 membranassoziiert ist (Abb. 41).

**Tab. 19:** Die Antigene, verwendeten Peptide und Referenzdaten der Immunisierungen von Kaninchen gegen LEC-2 (AS = Aminosäure).

Antigen	Offenes Leseraster	Peptid (Position im Protein)	Referenz Code	Antigencode	Kaninchen Nr.
LEC-2	F52H3.7a	-CVHDPVDGASSDAPAE- (AS 422-436)	ZDE06194	EPO62429-KLH-MBS	3163
		-DAAHPETATPESGSEE- (AS 893-908)	ZDE06195	EPO62430-KLH-GLUTA	3164



**Abb. 40:** Western Blot mit dem Serum der ersten Blutung nach Immunisierung gegen LEC-2. Die unterschiedlich großen Genprodukte, verursacht durch mehrere Splicingvarianten des Proteins LEC-2 (F52H3.7a: 124kDa, F52H3.7b1 und F52H3.7b2: 28kDa) werden von Antikörpern nach der Immunisierung erkannt. \* = nur sekundärer Antikörper, PPI = Präimmunserum, PP = Serum des immunisierten Kaninchens, jeweils 1:6000 im PBST, sekundärer Antikörper Ziege gegen Kaninchen (HRP-gekoppelt) 1:1500 in PBST.



**Abb. 41:** Antikörperfärbungen von Wildtyp Embryonen gegen LEC-2. Präimmunserum und immunisiertes Serum der ersten Blutung. (A) bis (C) Präimmunserum von Kaninchen 3164, (D) bis (F) Serum des immunisierten Kaninchens 3164. Primärer Antikörper jeweils 1 : 100 in TBST, sekundärer Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, Cyber 3 gekoppelt) jeweils 1 : 250 in TBST. Die Antikörper färben die Zellmembranen.

### Existieren in *C. elegans* spezifische Membran-Glykosylierungen?

Die Anordnung von differenzierten Zellen in einem Embryo zur Bildung distinkter Gewebe wird als Musterbildung bezeichnet. Es gibt prinzipiell zwei unterschiedliche Modelle der Musterbildung. Einerseits können die embryonalen Zellen nach ihrer Proliferation im Embryo vor Ort in diejenigen Zelltypen differenzieren, die an der entsprechenden Stelle benötigt werden. Diese Art der „regulativen Musterbildung“ findet zum Beispiel in *Drosophila melanogaster* statt (Lawrence und Sampedro 1994, Lawrence und Morata 1994, Wolpert 1994, DiNardo *et al.* 1994). Das Auftreten von Zellen bestimmten Schicksals an der falschen Position ist nicht möglich, da die Differenzierung erst spät vor Ort reguliert wird. Im Gegensatz dazu findet bei der „determinierten Musterbildung“ wie in *C. elegans* schon sehr früh in der Embryogenese die Determinierung der Zellschicksale statt (Drabikowski *et al.* 2005, Baugh *et al.* 2005, Robertson *et al.* 2004, Bowerman *et al.* 1997) und die früh determinierten Zellen sortieren im Laufe der Entwicklung durch Migrationen an diejenigen Positionen im Embryo, an denen das entsprechende Gewebe normalerweise ausgebildet werden soll (Bischoff und Schnabel, 2006, Schnabel *et al.* 2006). Seit der Entdeckung von globalen Migrationsbewegungen durch das komplette embryonale Feld und die Einführung der Hypothese der Zellfokussierung (siehe Einleitung und Schnabel *et al.* 2006) stellt sich die Frage, wie die früh determinierten Zellen ihren Weg durch das Embryo und die endgültige Position im späten Embryo finden. In *sud-1* Embryonen ist der Mechanismus der Zellfokussierung offensichtlich defekt, wobei wie schon mehrfach diskutiert, leider nicht unterschieden werden kann, ob dies auf eine Einschränkung der Zellmobilität *per se* oder auf eine zellführende Funktion zurück zu führen ist. Die

Galectine LEC–1, LEC–2 und LEC–4, deren Interaktion mit SUD–1 im Yeast-Two-Hybrid und zum Teil mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen wurde, scheinen dosisabhängig ebenfalls am Prozess der Zellfokussierung beteiligt zu sein, denn bei RNA-Interferenzen verursachen sie den gleichen Phänotyp wie *sud–1*.

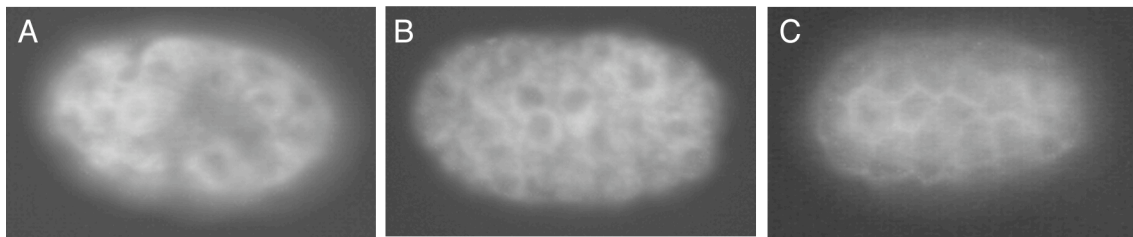
Mit der Differenzierung der Zellen in bestimmte Zelltypen geht eine Zelltyp-spezifische Glykosylierung von Oberflächenproteinen einher (Parekh *et al.* 1987, Paulson und Colley, 1989, Walsh *et al.* 1989, Houle *et al.* 1989) und in *C. elegans* wurden bereits viele Glykosyltransferasen gefunden, die teilweise spezifisch in der Embryogenese charakteristische Glykane synthetisieren (Chen *et al.* 1999, Charles *et al.* 2001, Layden *et al.* 2001). Für unterschiedliche postembryonale Entwicklungsstadien wurden ebenfalls spezifische N-Glykane und Glykolipide identifiziert (Cipollo *et al.* 2005, Gerdt *et al.* 1999). Da in dieser Arbeit die Karbohydrat bindenden und Zelladhäsion vermittelnden Galectine als mögliche Mediatoren der Zellfokussierung gefunden wurden, ergibt sich für den Mechanismus der Zellfokussierung die Frage, ob spezifisch modifizierte Glykoproteine in eine Modulation der Zelladhäsion und/oder der Zellführungssignale involviert sind, z.B. zur Unterscheidung der 8 von AB abgeleiteten Regionen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde versucht, Unterschiede der Oberflächenglykosylierung bei den Zellen und so verschiedene AB-Regionen sichtbar zu machen. Lectine sind Proteine, die spezifisch über bestimmte Glykosylierungsmodifikationen andere Proteine binden. Zur ersten Prüfung der oben formulierten Frage wurden daher Immunfluoreszenzfärbungen mit FITC-gekoppelten Lectinen unterschiedlicher Affinität in Wildtyp Embryonen durchgeführt (Tab. 20). Sollten die AB-Zelllinien unterschiedliche Oberflächenglykosylierungen aufweisen, so müssten Regionen unterschiedlicher Färbungsintensität entstehen, ähnlich den Regionen in den 3D-Repräsentationen von Wildtyp Embryonen.

**Tab. 20:** Die verwendeten Lectine, ihre spezifischen Glykosylierungsstrukturen und die von ihnen in Wildtyp Embryonen angefärbten Strukturen.

Lectin (Ursprung)	Glykosylierungsstruktur	färbt in Wildtyp-Embryonen
DBA ( <i>Dolichos biflorus</i> )	GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser & GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc	keine Färbung
UEA-1 ( <i>Ulex europaeus</i> )	Fuca1-2LacNAc	Zytoplasma
PHA-E4 ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	NA2 & „bisecting“ GlcNAc	keine Färbung
LCA ( <i>Lens culinaris</i> )	Fuc1-6GlcNAc & $\alpha$ -Man, $\alpha$ -Glc	Zytoplasma
PNA ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Gal1-3 $\beta$ -GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser	Pharymx
ConA ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	$\alpha$ -Man	Zytoplasma
RCA ( <i>Ricinus communis</i> )	Lac/LacNAc	Saumzellen
WGA ( <i>Triticum unlgaris</i> )	GlcNAc	früh Membran

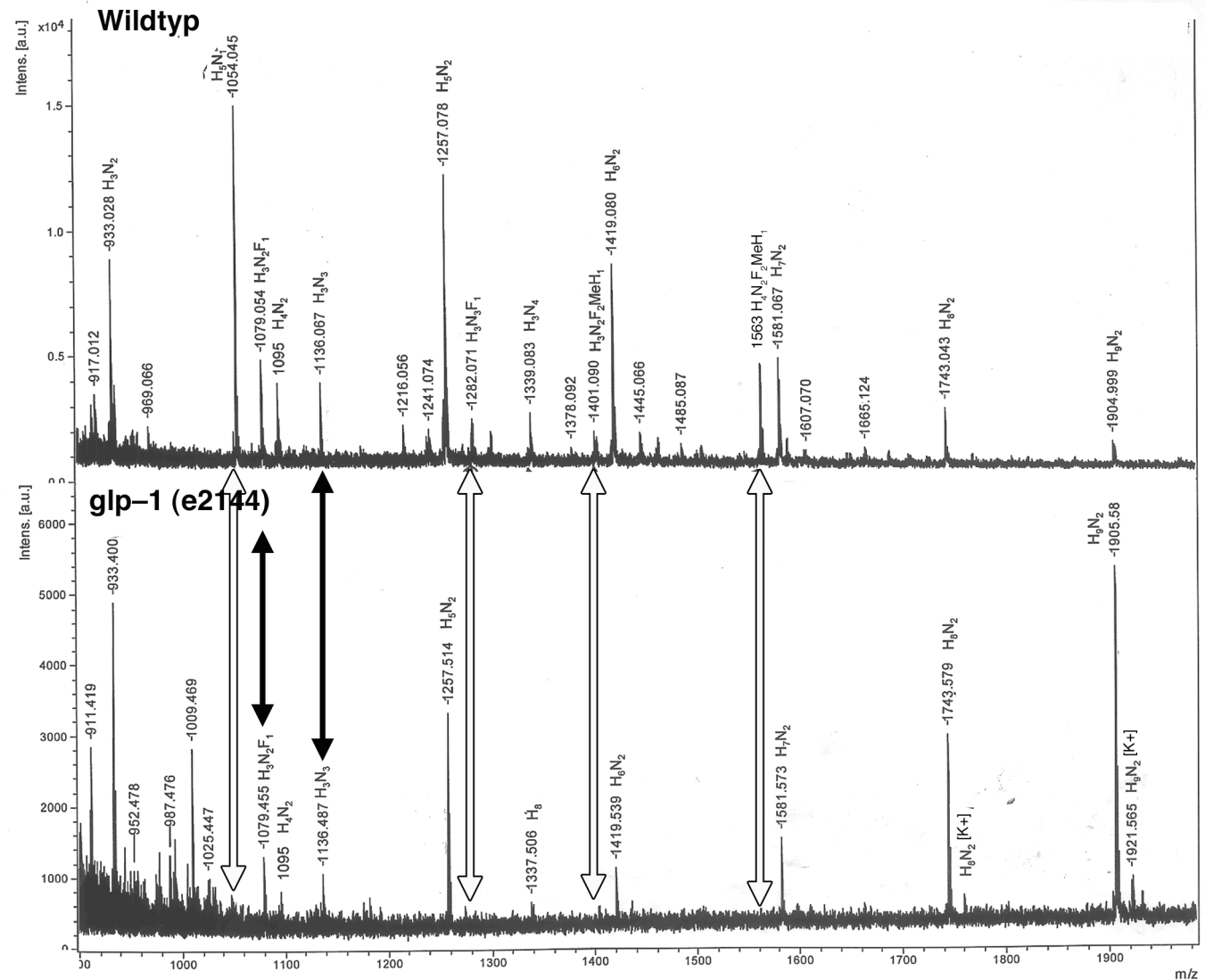
Es konnte gezeigt werden, dass die Lectine jeweils unterschiedliche Strukturen in den Zellen färben, einen Unterschied zwischen den Zellen innerhalb eines Embryon konnte allerdings nicht reproduzierbar und eindeutig festgestellt werden. Entweder sind die Lectinfärbungen nicht sensitiv genug, um eventuell vorhandene minimale Unterschiede auf der Zellmembran zu detektieren oder die Polysaccharid-Modifikationen sind strukturell so empfindlich, dass sie durch die Fixierung der Embryonen für die Erkennung durch Lectine zu stark verändert werden. Oder es gibt keine Unterschiede. (Abb. 42).



**Abb. 42:** Lectinfärbungen mit Wildtyp Embryonen. (A) ConA-FITC 1 : 100 in PBS, (B) LCA-FITC 1 : 250 in PBS, (C) WGA-FITC 1 : 100 in PBS.

Um zu klären, ob es eventuell schicksalsabhängige Oberflächenglykosylierungen gibt, wurden Hermaphroditen des Wildtyps und der temperatursensitiven Mutante *glp-1* (*e2144ts*) – in *e2144ts* gibt es bei der restriktiven Temperatur nur zwei statt der acht AB-Schicksale – in Flüssigkultur gezogen, und deren Embryonen für eine massenspektroskopische Analyse der Zelloberflächen assoziierten N-Glykosylierungen verwendet. Beim Vergleich der N-Glykane mittels MALDI-TOF im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Geyer und PD Dr. Lochnit in Gießen wurden deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und mutanten Embryonen sichtbar. Im Wildtyp, der 8 verschiedene AB-Schicksale hat, ist eine größere Vielfalt an komplexen Glykanen als in der Mutante vorhanden. Die *glp-1* Mutante produziert nur noch zwei AB-Schicksale (ABala und ABarp) und es wurden auch nur noch zwei Oligosaccharid-Spezies mit abweichender Kohlenhydrat-Zusammensetzung gefunden, nämlich H(3)N(2)F(1) und H(3)N(3). H, N und F stehen hier wieder für Hexose (Man), N-Acetylhexosamin (GlcNAc) und Fuc. Bei den Wildtyp Embryonen waren demgegenüber zusätzlich zu den bereits angesprochenen Spezies weitere Glykane mit z.T. 2 Fuc-Resten nachweisbar (Abb. 43). Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass ein zuckerspezifischer Code auf den Zellen zur Zellfokussierung benutzt wird. Dies ist eine interessante Beobachtung, die in der Zukunft weiter verfolgt werden sollte.

**Abb. 43:** Ergebnis der MALDI Analysen von Wildtyp und in *glp-1* homozygot mutierten Embryonen. Im Wildtyp, der 8 verschiedene AB-Schicksale ausbildet, ist eine größere Vielfalt und höhere Konzentration an prozessierten N-Glykanen vorhanden als in der *glp-1* Mutante (offene Pfeile). Die *glp-1* Mutante bildet nur noch zwei unterschiedliche AB-Schicksale aus, und es sind nur noch zwei prozessierte N-Glykane vorhanden (schwarze Pfeile). Dies ist ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den AB-Schicksalen und der N-Glykosylierung der Zellmembranen.





## Ausblick

Meine Analysen des *sud-1* Phänotyps dokumentieren ein komplexes phänotypisches Spektrum in *sud-1* Embryonen. Der auffälligste Phänotyp, der ursprünglich auch die Aufmerksamkeit des Labors auf dieses Gen gelenkt hat, ist eine starke Überproliferation der Zellen im Embryo. Alle somatischen Gründerzellen zeigen diese zusätzlichen Zellteilungen. In den vorgestellten Experimenten, in denen in Zellkultur *sud-1* mutante und Wildtyp-Blastomeren rekombiniert wurden, haben keinen Hinweis darauf gegeben, dass die beobachteten Defekte auf eine fehlerhafte Spezifizierung einzelner früher Blastomeren zurückzuführen sind. Vielmehr spricht alles dafür, dass SUD-1 in allen Zellen gebraucht wird. Es wird auch in allen Zellen exprimiert. Meine intensiven Analysen des Phänotyps mit dem 4D-Mikroskop zeigten, dass die Zellen von *sud-1* Embryonen zwar noch migrieren können, aber nicht das normale bzw. irgend ein anderes neues diskretes Muster bilden, das durch Identitätstransformationen früher Blastomeren erklärt werden könnte. Die immunochemischen Analysen haben die 4D-Analysen der Zellschicksale bestätigt, die ein völlig aberrantes Zelllinienmuster aufzeigten. Die meisten Gewebe mit Ausnahme einiger spezifischer Neuronen sind stark reduziert. Formal sind die Differenzierungsprobleme und die zusätzlichen Zellteilungen mit einer Funktion von SUD-1 als "rezessives Onkogen" vereinbar. Tatsächlich konnte ich zeigen, dass eine Hemmung der Überproliferation wieder zu einer verbesserten Differenzierung von Pharynxmuskulazellen führt. Dies spricht dafür, dass die generell schlechte Differenzierung der Zellen in *sud-1* Embryonen sekundär durch den Ausfall einer Zellzyklusinhibition am Ende der Embryogenese verursacht wird.

Allerdings war es auch mit vollständig neuen Methoden nicht möglich nachzuweisen, dass die frühen Zelldeterminationsprozesse in *sud-1* normal verlaufen. Diese neuen Methoden beruhen auf dem Prinzip, dass Zellen normalerweise immer gemäß ihres Schicksals migrieren. In *sud-1* Embryonen, bei deren Migrationen keinerlei Muster nachgewiesen werden kann, bleibt die Frage offen, ob primär die Zellschicksale oder die Zellmigrationen abnormal sind.

Die Klonierung des Gens durch Thomas Wilm hat zunächst keinerlei Hinweise auf die Funktion des Gens gegeben. Die oben beschriebenen Blastomer-Rekombinationsexperimente ergaben einen ersten Hinweis auf eine zellbiologische Funktion des Gens. Die Adhäsion der Zellen zueinander ist in *sud-1* mutanten Zellen sehr viel schwächer als in Wildtypzellen. Mit einem neuen Antikörper gegen SUD-1 konnte dann eine Membranassoziation von SUD-1 gezeigt werden, was im Einklang mit der Funktion von SUD-1 bei der Zelladhäsion steht.

Da wie schon beschrieben ursprünglich keine bioinformatische Zuordnung einer potentiellen Funktion möglich war, habe ich einen Yeast-Two-Hybrid Screen auf Interaktionspartner des Moleküls durchgeführt, in der Hoffnung, das Molekül über möglicherweise schon bekannte Interaktionspartner einem Signalweg zuordnen zu



können. Dabei wurden fünf Galectine als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Wie zu erwarten konnte mit neuen Antikörpern gegen die Galectine LEC-1, LEC-2 und LEC-3 gezeigt werden, dass diese membranständig sind. Systematische RNA-Interferenz-Experimente mit einzelnen und vielen Kombinationen von Galectinen haben gezeigt, dass mit einer spezifischen Kombination der Galectine LEC-1, LEC-2 und LEC-4 der *sud-1* Phänotyp phänotypisch kopiert werden kann. Dies ist neben den biochemischen Experimenten, der Copräzipitation von SUD-1 und den Galectinen ein guter Hinweis, dass SUD-1 und die Galectine im *C. elegans* Embryo interagieren. Leider war es mit diesen RNA-Interferenzexperimenten nicht möglich, die drei pleiotropischen Aspekte des *sud-1* Phänotyp, Zelldetermination, Zellmigration und "Onkogene" Überexpression, zu separieren. Um diese Funktionen trennen zu können ist es nötig, die Funktion von SUD-1 oder den Galectinen in spezifischen Entwicklungsstadien des Embryos zu inhibieren. Dies könnte idealerweise mit temperatursensitiven Mutationen in den beteiligten Genen geschehen. Leider liegen keine solchen Mutationen vor, allerdings plant das Schnabellabor, die Zahl von temperatursensitiven Mutanten demnächst von den momentan vorliegenden ca. 1000 auf 10.000 zu erhöhen.

Die früheste Funktion der Galectine scheint eine Stabilisierung der Membranen in der Zellteilungsfurche zu sein. Eine starke Inhibition ihrer Aktivität führt bereits im frühen Embryo zu Endomitosen. Diese Funktion der Galectine scheint eine neue Entdeckung zu sein. Eine intensive Recherche in PubMed hat keine Hinweise ergeben, dass dieses Phänomen schon beschrieben wurde.

Es ist einer ansonsten eigentlich störenden Eigenschaft der RNA-Interferenz, dass die Inaktivierung der Genaktivität nur langsam einsetzt zu verdanken, dass eine *sud-1* ähnliche oder gleiche Funktion der Galectine nachgewiesen werden konnte. So konnte der *sud-1* Phänotyp nicht durch eine schon frühere Störung der Zellteilungen überdeckt werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit zu der Erkenntnis geführt, dass SUD-1 ein Zelladhäsionsmolekül ist und mit Galectinen interagiert. Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass eine spezifische Modulation der Zelladhäsion möglicherweise durch eine gezielte Konzentrierung der verschiedenen Galectine in Konzentration und Diversität notwendig ist, um in verschiedenen Stadien der Embryogenese auch gemeinsam mit SUD-1 die verschiedenen Prozesse zu regulieren, wie auch die gezielten Zellmigrationen im Embryo. Die hier beschriebenen Phänomene lassen sich mit zwei spezifischen Adhäsionen erklären.

- Die Adhäsion zu den Nachbarzellen ( $A_N$ ) ist essentiell für die Zellführung und die Zellkommunikation:  $A_N$  vermittelt den Zellen die notwendige Adhäsion zur Mobilität im zellulären Verband. Diese wird von SUD-1 und einer Untergruppe von Galectinen vermittelt. Wird die Anzahl der an  $A_N$  beteiligten Proteine durch Mutation und RNA-Interferenz nach und nach reduziert, so nimmt auch die (gezielte) Migrationsfähigkeit

immer mehr ab und die terminalen Positionen der Zellen weichen immer mehr von denen des Wildtyps ab.

- Die Adhäsion während der Mitose ( $A_D$  [engl.: division]) ist essentiell für die Zytokinese. Wenn eine Zelle eine Teilung durchführt, verändert sie dabei ihre komplette Membranarchitektur. Einerseits muss die Adhäsion zu den Nachbarzellen aufgelöst werden, damit die Zelle sich im zellulären Verband abrunden und die Membran in der Teilungsfurche einschnüren kann. Andererseits muss während des Zusammenziehens des kontraktilen Ringes eine signifikante Zelladhäsion etabliert werden, damit sich die Membran in der Teilungsfurche etablieren kann. Kurz nach der Zellteilung muss dann wieder die vorherige Adhäsion zu den Nachbarzellen aufgebaut werden. In der Hoffnung, Galectinen spezifische Funktionen zuzuordnen, wurden sehr viele verschiedene Kombinationen inaktiviert. Dabei konnte ich zeigen, dass eine Inaktivierung von LEC-1 zusammen mit LEC-2 möglicherweise dosisabhängig zu einem "sud-1" Phänotyp führt.

Meine Arbeiten weisen darauf hin, dass die Zelladhäsion vor der Morphogenese des *C. elegans* Embryos sehr subtil mit Hilfe eines Galectin abhängigen Zelladhäsionssystems reguliert wird. SUD-1 ist eine neue Komponente in diesem System, die anscheinend nicht für die Zellteilungen, sondern nur für die von mir  $A_N$  genannte Zelladhäsion gebraucht wird, die die Zellmigration und wohl auch die Zellkommunikation beeinflusst. Bisher war es eine ungelöste Frage, wie im frühen *C. elegans* Embryo die Zelladhäsion moduliert wird, da eine Inaktivierung der bekannten Zelladhäsions-„Klassiker“, wie Cadherine, Catenine und Integrine keine Auswirkungen zeigten.

Die Funktion der Galectine als Ankerproteine zwischen Zelle und ECM ist aus einer enormen Anzahl von Arbeiten, die allerdings praktisch alle in Zellkulturen durchgeführt wurden, schon länger bekannt (z.B. Kuwabara *et al.* 1996). Es gibt viele Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Zellspezifizierung und der Oberflächenglykosylierung, die vermuten lassen, dass die Feineinstellung von unterschiedlichen N-Glykanen an Membranproteinen und Membranlipiden zu der Navigation der Zellen beiträgt, und dass die Galectine zu den Proteinen zählen, die diesen Zuckercode ablesen und in geführte Migrationen umsetzen. Ihre unterschiedlich starke Affinität zu verschiedenen Oligosacchariden bietet die Grundlage für eine mögliche differenzielle Adhäsion, die einer der möglichen Mechanismen zur geführten Zellmigration ist. Einige der hier vorgestellten Beobachtungen, speziell die Tatsache, dass eine Inhibition der exzessiven Zellproliferation wieder eine bessere Differenzierung ermöglicht, lassen mich vermuten, dass SUD-1 und die Galectine auch an dieser Zellführung beteiligt sind. Leider konnte ich dies nicht stringent zeigen.

Bisher wurde allgemein angenommen, dass der Zellzyklus des *C. elegans* Embryos unabhängig von den Nachbarn "autonom" reguliert wird. Diese Arbeit legt

nahe, dass gegen Ende der Embryogenese eine intakte Zelladhäsion notwendig ist, um die generelle Proliferation der Zellen zu stoppen. Dass Zellwechselwirkungen zu einer Unterdrückung von Zellproliferationen notwendig sind, ist für Vertebraten eine etablierte Tatsache. Die letzten Jahre haben eine immer größere Ähnlichkeit der Zellbiologie von *C. elegans* mit allen anderen Organismen gezeigt. Noch vor 10 Jahren hingegen galt *C. elegans* als ganz "anders". Es würde mich nun nicht überraschen, wenn man nun auch noch mit *C. elegans* funktionell (genetisch) an einer durch den Zellverband regulierten Zellzyklusregulation arbeiten könnte.

Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen, wie schwierig es auch mit den vorzüglichen Techniken, die für den Wurm zur Verfügung stehen, sein kann, die komplexe und vernetzte Wirkungsweise der Galectine und ihre Funktion als Zelladhäsionsmoleküle – die in einer ungeheuren Anzahl von *in vitro*-Experimenten analysiert wird - in der Embryonalentwicklung *in vivo* zu analysieren. Da es sich bei den Galectinen um eine hoch konservierte und weit verbreitete Proteinfamilie handelt, hoffe ich, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nicht als *C. elegans* spezifisch betrachtet werden müssen. Die Mechanismen der Weg- und Zielfindung migrierender Zellen, ihre gegenseitige Erkennung sowie der Wechsel von einem aktiven Zellzyklus auf die terminale Differenzierung sind nicht nur in *C. elegans* noch weitgehend ungelöste Probleme.

## **Material und Methoden**

## 4D-Mikroskopie

Die 4D-Mikroskopie beruht auf einem von Schnabel *et al.* (1997) entwickelten System. Im Unterschied zu diesem System werden die Aufnahmen nicht analog auf Sony Laser-Videodisks gespeichert, sondern digital auf einer 80GB Wechselplatte. Ein "framegrabber" (Inspecta 2, Mikrothron, Eching) digitalisiert die analogen Bilder, die dann einzeln auf der Wechselplatte gespeichert werden.

Die Embryonen werden wie von Sulston und Hodgkin (Wood *et al.*, 1988) beschrieben für die 4D-Mikroskopie präpariert. Die Aufnahmen erfolgen bei 25°C.

- Verwendete Software: SIMI® BioCell Version 4.0 build 151

- Technische Daten der verwendeten Mikroskope:

Modell: Axioplan und Axioplan 2 von Zeiss mit Nomarski-Technik

Okular: Zeiss 10x25 B

Objektiv: Zeiss Plan-Noefluar 100x/1,3

Optovar: 1,5-fache (Axioplan) bzw. 1,4-fache Nachvergrößerung  
(Axioplan 2)

Newicon-Kamera von Hamamatsu (C2400)

Eine Pifoc-Fokussierung (Physik Instrumente) zwischen Objektiv und Objektivreol-  
ver verändert die Brennweite der Optik durch Bewegung des Objektives. Die Mikro-  
skope werden von einem von Anja-Kristina Schulz und Ralf Schnabel entwickelten  
Programm vollständig Computer gesteuert.

## Entschalen von Embryonen und Mosaikembryonen

Das Entfernen der Eischale sowie das Zusammenlegen von embryonalen Blastome-  
ren verschiedener Genotypen wurde von Markus Bischoff durchgeführt (Bischoff M.,  
2000).

## Kultivierung von *C. elegans*

Die Würmer werden für die Experimente auf kleinen ( $\varnothing$  35 mm) und großen ( $\varnothing$  85 mm) NGM-Platten gehalten. Zum Lagern für bis zu zwei Monate werden die Würmer auf so genannte STOCK-Platten ( $\varnothing$  50 mm) gesetzt. Auf die NGM-Platten wird 2-3 Tage vor dem Animpfen mit Würmern ein Bakterienrasen mit dem *E. Coli*-Stamm OP50 als Futtergrundlage ausplattiert. Wenn die Platten so stark bewachsen sind, dass kein Bakterienfutter mehr sichtbar ist, wird mit einem abgeflammtten Skalpell ein kleines viereckiges Stückchen aus der NGM-Platte ausgeschnitten und umgedreht auf eine frische NGM-Platte mit Bakterien gelegt. Die Würmer auf den STOCK-Platten werden alle zwei Monate umgesetzt.

NGM Platten (1 L):	3 g	NaCl
	29 g	Agar Agar
	10 g	fettes Pepton (gr.und STOCK Platten)
	7 g	fettes Pepton (kleine Platten)
	2 ml	Cholesterinlösung (5 g/L EtOH)
	950 ml	H <sub>2</sub> O dest.

Folgende Lösungen werden separat autoklaviert und dem NGM-Medium nach Abkühlen auf 60°C hinzugefügt:

5 ml	CaCl <sub>2</sub> [0,1M]
5 ml	MgSO <sub>4</sub> [0,1M]
25 ml	Kaliumphosphatlösung [1M, pH = 6]
5 ml	Succhroselösung [20%], nur für STOCK und große Platten
5 ml	Nystatinlösung sterilfiltriert (kl. und gr. Platten)
10 ml	Nystatinlösung sterilfiltriert (STOCK Platten)

Nystatinlösung (400 ml):	4 g	Nystatin
	200 ml	EtOH
	200 ml	Ammoniumacetatlösung

Zum Lösen des Nystatins abwechselnd EtOH und Ammoniumacetatlösung zugeben  
 Ammoniumacetatlösung (300 ml): 173,43 g Ammoniumacetat in 100 ml Wasser  
 lösen und anschließend auf 300 ml auffüllen

## Kreuzungen

Für eine Kreuzung zweier unterschiedlicher Stämme werden 4 Hermaphroditen im L4- Stadium des einen Stammes mit 16 jungen adulten Männchen des anderen Stammes zusammen auf eine kleine, mit einem OP50-Tropfen angeimpfte NGM-Platte transferiert. Der Kreuzungsansatz wird entweder über Nacht bei 20°C oder für zwei Tage bei 15°C inkubiert. Wenn die Hermaphroditen befruchtet sind und mit der Eiablage beginnen, werden sie auf kleinen NGM-Platten vereinzelt und die Phänotypen der F1-Generation abgewartet. Wenn 50% der Nachkommen Männchen sind, geht man davon aus, dass die Kreuzung erfolgreich war und eine Befruchtung durch Männchen stattgefunden hat.



### Erzeugung einer *sud-1;glp-1*-Doppelmutante

Zur Erzeugung der Doppelmutante wurden für eine Kreuzung (Abb. A1) jeweils 16 Männchen mit den Mutationen *dpy-2 (e8) sud-1 (t1242)* auf Chromosom II, in *trans* zu dem Balancerchromosom mnC1 (Stammnr. GE1062), mit vier in *glp-1 (e2144ts)* mutierten Hermaphroditen (Stammnr. GE68) auf einer kleinen NGM-Platte bei 15°C zwei Tage lang zusammen inkubiert. Sobald die Hermaphroditen befruchtet waren und mit der Produktion von Eiern begonnen haben, wurden sie auf jeweils eine kleine NGM-Platte vereinzelt und die Phänotypen der F1-Generation abgewartet. Nur die Hermaphroditen, die ausschließlich Wildtypen mit einem Männchen-Anteil von 50% produzierten, wurden als erfolgreich befruchtet gewertet. Die F1-Wildtypen konnten dabei zwei verschiedene Genotypen haben (s. Abb. 43 Fall A und B). Es wurden die Wildtyp-Männchen der F1-Generation mit *sud-1 (t1242)* mutierten Hermaphroditen wie oben beschrieben zurückgekreuzt, und die befruchteten Hermaphroditen wieder vereinzelt. Je nachdem, welchen Genotyp die F1-Männchen hatten, erhielt man eine F2-Generation mit der phänotypischen Aufspaltung Wildtyp:Dpy im Verhältnis 3:1 (Fall A) oder Wildtyp:Balancer (mnC1) im Verhältnis 3:1. Von den Wildtypen der F2 wurden Hermaphroditen zur Selbstbefruchtung auf kleinen Platten vereinzelt und nur mit den Platten weitergearbeitet, auf denen Dpy-Würmer sichtbar waren bzw. der homozygote Balancer mnC1. Von diesen Platten wurden wiederum L4-Larven von 15°C auf 25°C geshiftet. Die Hermaphroditen, die dann bei 25°C tote Eier abgelegt haben, wurden sofort wieder zu 15°C gestellt, um sie zu retten, denn sie hatten den erwünschten Genotyp: die Mutation von *sud-1*, gekoppelt an *dpy-2* auf Chromosom II in *trans* zu dem Balancerchromosom mnC1, und die Mutation *glp-1* homozygot auf Chromosom III. Von dieser Doppelmutante wurden sogleich von vier unterschiedlichen Klonen drei Kopien zur Konservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren (Einfriernummern 3895, 3896, 3897, 3989) und Embryonen mittels 4D-Mikroskopie bezüglich der Zellsortierungen und AB-Spezifizierungen analysiert.

$$P_0: \quad \text{♂} \quad \frac{II_{dpy-2 (e8) sud-1 (t1242)}}{mnC1} ; II_{him-3} ; \frac{III_+}{+} \quad \times \quad \text{♀} \quad \frac{II_+}{+} \quad \frac{III_{glp-1 (e2144)}}{glp-1 (e2144)}$$

 $F_1:$ 

♀ ♂	$II_{dpy-2 (e8) sud-1 (t1242)} \quad III_+$	$II_{mnC1} \quad III_+$
$II_+ \quad III_{glp-1 (e2144)}$	$\frac{II_{dpy-2 (e8) sud-1 (t1242)}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1 (e2144)}}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1 (e2144)}}$ Wildtyp
	Fall A	Fall B

 $F_2(\text{Fall A}):$ 

♂ ♂	$II_{dpy-2 sud-1} \quad III_+$	$II_{mnC1} \quad III_+$
$II_+ \quad III_{glp-1}$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp
$II_{dpy-2 sud-1} \quad III_+$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_{dpy-2 sud-1}} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Dumpy	$\frac{II_{mnC1}}{II_{dpy-2 sud-1}} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp
$III_+ \quad III_+$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{III_+} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{III_+} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp
$II_{dpy-2 sud-1} \quad III_{glp-1}$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_{dpy-2 sud-1}} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Dumpy	$\frac{II_{mnC1}}{II_{dpy-2 sud-1}} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp

 $F_2(\text{Fall B}):$ 

♂ ♀	$II_{dpy-2 sud-1} \quad III_+$	$II_{mnC1} \quad III_+$
$II_{mnC1} \quad III_+$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_{mnC1}} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{II_{mnC1}} \quad \frac{III_+}{III_+}$ MnC1
$II_+ \quad III_{glp-1}$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{II_+} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp
$II_+ \quad III_+$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{III_+} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{III_+} \quad \frac{III_+}{III_+}$ Wildtyp
$II_{mnC1} \quad III_{glp-1}$	$\frac{II_{dpy-2 sud-1}}{II_{mnC1}} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ Wildtyp	$\frac{II_{mnC1}}{II_{mnC1}} \quad \frac{III_+}{III_{glp-1}}$ MnC1

**Abb. A1:** Kreuzungsschema zur Herstellung einer *sud-1(t1242)-glp-1(e2144ts)*-Doppelmutante. Es sind nur die Chromosomen II und III schematisch dargestellt, alle andere Chromosomen sind stets wie beim Wildtyp. In den Punnet-Quadraten sind die Allelnummern nicht mit aufgeführt. Erläuterungen siehe Text.

## Flüssigkultur mit *C. elegans*

### 1.) Futter vorbereiten

#### a) in Erlenmeyerkolben:

- DYT-Medium abends mit dem *E.coli*-Stamm OP50 animpfen und ü.N. bei 37°C auf einem großen Schüttler inkubieren.
- Am nächsten Tag die Bakterien bei maximaler Zelldichte ( $OD_{550} = 2$ ) mit 6000 upm 10 min abzentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Bakterienpellet in M9-Puffer resuspendieren und in ein 50 ml Falconröhrchen überführen.
- Bakterien erneut mit 5000 upm 30 min pelletieren und den Überstand absaugen.
- Bakterienpellet mit M9 Puffer zu gewünschter Konzentration resuspendieren und bis zum Gebrauch bei -20°C einfrieren.

DYT Medium (1 L):	20 g	Trypton
	10 g	Yeast-Extract
	5 g	NaCl
	pH 7,5	
M9 Puffer (1 L):	3 g	$KH_2PO_4$
	6 g	$Na_2HPO_4$
	5 g	NaCl
	1 ml	$MgSO_4$ [1M]

#### b) mittels Fermentation:

- DYT-Medium in einer Menge von 10% des Fermentationsvolumens auf mehrere große Erlenmeyerkolben mit Schikane verteilen, sterilisieren, und mit OP50 animpfen .
- Ü.N. bei 37°C auf einem großen Schüttler kultivieren bis  $OD_{550} = 2.0$  ist.
- Am Vorabend der Fermentaion oder am Fermentationstag morgens das übrige Fermentationsvolumen in dem Fermenter vorbereiten und autoklavieren.
- Nachmittags das Inokulum steril in den Fermenter überführen und die Fermentati-on starten und fermentieren, bis das Ende des Bakterienwachstums erreicht ist :

Fermentationsparameter:

Rührer-Drehzahl: 300 upm

Temperatur: 37°C

pH 7,5 (ungeregelt)

Begasung: 0,5 vvm

### 2.) Flüssigmedium vorbereiten

In einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen und breitem Hals 0,5 L S-Basal Medium herstellen, Kolben mit einem Wattestopfen verschließen und autoklavieren.

S Basal Medium (0,5 L):	3 ml	$Na_2HPO_4$ [1M]
	22 ml	$NaH_2PO_4$ [1M]
	457 ml	$H_2O$ dest
	2,9 g	NaCl

Nach dem Autoklavieren werden dem S-Basal die folgenden Lösungen steril hinzugefügt:

0,5 ml	Cholesterinlösung
(5 g	Cholesterin auf 1 L Ethanol [100%])
1,5 ml	MgSO <sub>4</sub>
1,5 ml	CaCl <sub>2</sub>

### 3.) Flüssigkultur animpfen

- Eine möglichst synchrone Wurm- bzw Larvenpopulation in M9-Puffer in das fertige S-Basalmedium (mit zusätzlichen Lösungen) gegeben.
- Durch die Zugabe von ca. 10 g Bakterienfutter das Wachstum der Würmer starten.
- Den Kolben mit der Wurmkultur auf einem Schüttler bei geeigneter Temperatur bei ca. 80 upm langsam schütteln.
- Die Flüssigkultur muss in der Wachstumsphase stets durch genügend Bakterien stark trüb sein, darum sofort Bakterien nachfüttern, wenn die Trübung nachlässt (die Kultur verhungert sonst sehr schnell!).

### 4.) Flüssigkultur ernten

- Ist die Flüssigkultur beendet (das Medium ist gelblich und deutlich klarer, und die Würmer sind voll Eier) die Kultur in einem vorgekühlten 500 ml Messzylinder auf Eis schütten, evtl. etwas Eis oben in den Zylinder dazugeben.
- Die Würmer in dem Zylinder 2-3 Stunden sedimentieren lassen.
- Mit einer Wasserstrahlpumpe den Überstand über den Würmern so vollständig wie möglich entfernen.
- Die Würmer in 250 ml Zentrifugenröhrchen aufteilen und den Messzylinder mit ein wenig M9-Puffer nachspülen.
- Je nach Bedarf die Würmer bleichen, um deren Embryonen zu erhalten, oder die Würmer mit M9-Puffer waschen.

### benötigte Puffer:

#### **M9 (1L):**

3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
6 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
(oder 7,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)
(oder 15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O)
5 g	NaCl
1 ml	MgSO <sub>4</sub> [1M]

#### **PBS (1L) pH 7,2:**

71,7 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [0,5M]
28,3 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [0,5M]
8,57 g	NaCl

## Molekularbiologische Methoden

### Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA („Mini“-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturen erfolgt gemäß dem Protokoll des QIAprep® 8 Miniprep Kit (50) von QIAGEN, Kat. Nr. 27144.

### Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA („Midi“-Präparation)

Die Plasmidaufreinigung in größeren Mengen erfolgt nach dem Protokoll des QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) Kat. Nr.12145. Folgende Arbeitsschritte werden jedoch geändert:

- Die Zellen der Hauptkultur werden nicht 15 min bei 6.000 upm zentrifugiert, sondern 5 min bei 6000 upm.
- Nach der Fällung der DNA mit 3,5 ml Isopropanol wird sofort 30 min bei 4°C und 10.000 upm zentrifugiert, das Pellet mit 10 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 4°C und 10.000 upm zentrifugiert und 10 min an der Luft getrocknet.
- Zum Schluss wird das Pellet in 100-200 µl TE pH 8,0 suspendiert und bei -20°C zum Lagern eingefroren.

### DNA-Restriktionen

Die Restriktion von DNA wird nach dem folgenden Standardansatz durchgeführt:

0,5 µl Restriktionsenzym (i.d.R. 5 Units)  
 1,0 µl entsprechender 10fach-Puffer  
 2,0 µl DNA aus der "Mini"- bzw. "Midi"-Präparation  
6,5 µl H<sub>2</sub>O dest.

Σ10,0 µl

Dieser Reaktionsansatz wird 3h bei der optimalen Reaktionstemperatur des Enzyms inkubiert.

### Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

- Die zu extrahierenden DNA-Fragmente in einem 0,8%igen TAE-Agarosegel über Nacht bei max. 40 V auftrennen.
- Gemäß dem Protokoll von Macherey-Nagel, NucleoSpin® extract Kat. Nr. 740609.250 die DNA aus dem Gel extrahieren.

### Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Der Standardansatz für Ligationen ist:

1 µl T4 Ligase  
 2 µl 5x Ligasepuffer  
 x µl geschnittener Vektor  
 x µl Insert  
x µl H<sub>2</sub>O dest.

Σ10 µl

Die Menge an geschnittenem Vektor und Insert richtet sich nach der Konzentration der jeweiligen DNA-Lösung. Es wird Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Die Reaktion über Nacht bei 16°C inkubieren.

### Dephosphorylierung von Vektoren

Den folgenden Reaktionsmix ansetzen:

10 – 40 $\mu$ l	1-2 $\mu$ g DNA
5 $\mu$ l	10x Reaktionspuffer
ad 49 $\mu$ l	deionisiertes Wasser
1 $\mu$ l	alkaline Phosphatase (1u)

- Den Mix maximal 20 min bei 37°C inkubieren.
- Durch 15 min Inkubation bei 85°C die Reaktion stoppen.
- Die Reaktion weiter stoppen durch die Zugabe von:

150 $\mu$ l	TE
200 $\mu$ l	PCIA

- Diese Mischung vortexen und 10 min bei 13.000 upm zentrifugieren.
- Den Überstand in ein neues Eppendorff-Gefäß überführen und aufreinigen. (Macherey-Nagel, NucleoSpin® extract Cat. no. 740609.250)
- Zum Prüfen der Aufreinigungs-Effizienz 1  $\mu$ l der aufgereinigten DNA in einem 1%igen TBE-Agarosegel auftrennen.

### Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die PCR-Reaktionen werden in den Thermocyclern "Mastercycler gradient" bzw. "Mastercycler personal" von der Firma eppendorf® durchgeführt.

Der Standardansatz für die PCR-Reaktionen ist:

39,5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O dest.
1 $\mu$ l	Primer I [25 pmol/ $\mu$ l]
1 $\mu$ l	Primer II [25 pmol/ $\mu$ l]
2,5 $\mu$ l	dNTP's [25 $\mu$ mol/ml]
5 $\mu$ l	10facher Puffer für die PFU-turbo-Polymerase
1 $\mu$ l	PFU-turbo-Polymerase
1 $\mu$ l	Template-DNA (1:10 mit H <sub>2</sub> O dest. verdünnt) (ca. 50 ng)
<hr/>	
$\Sigma$ 50 $\mu$ l	

Um die Effizienz der PCR zu prüfen, werden 1  $\mu$ l des PCR-Ansatzes in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

### Aufreinigung von PCR-Produkten

Das PCR-Produkt einer erfolgreichen PCR wird gemäß dem Protokoll von Macherey-Nagel, NucleoSpin® extract Cat. no. 740609.250 aufgereinigt.



## DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der Kettenabbruchmethode mit dem ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, Part Number 4336772).

Zuerst wird in einem Thermocycler die Cycle Sequencing PCR-Reaktion durchgeführt.

Standardansatz für die Cycle Sequencing PCR:

0,5	μl	zu sequenzierende DNA
1	μl	Sequenzierprimer [5pmol/μl]
2	μl	Sequenzierpuffer [5x]
2	μl	Premix
4,5	μl	H <sub>2</sub> O dest.
<u>Σ 10</u>		μl

Standardprogramm für die Cycle Sequencing PCR (CYCLESEQxx):

- 1) 96°C      3 sec
  - 2) xx°C      15 sec
  - 3) 60°C      4 min
- 25 Zyklen (Schritte 1 bis 3)

Nach der PCR wird die DNA ausgefällt:

- 10 μl PCR-Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen.
- 40 μl H<sub>2</sub>O dest., 5 μl NaAc [3M, pH5,2], 125 μl Ethanol [100%] und 1 μl Dextranblau hinzufügen.
- 15 min mit 13000 upm zentrifugieren.
- Überstand abgießen und Pellet mit 125 μl Ethanol [70%] waschen.
- 5 min mit 13000 upm zentrifugieren.
- Pellet an der Luft oder im SpeedVac trocknen.
- Pellet in 12,5 μl Template Supression Reagent (Applied Biosystems, Part Number 401674) lösen und 2 min in einem 90°C Wasserbad kochen.
- Lösung sofort auf Eis stellen und in ein 0,5 ml Sample Tube mit Septum (Applied Biosystems, Part Numbers 401957, 401956) überführen.
- Lösung bis zur Analyse in einem Sequenzierer (Applied Biosystems) bei 4°C lagern.

## Colony-PCR mit Hefen

- Möglichst frische Hefeklone verwenden, mit älteren Klonen aus dem Kühlschrank funktioniert die Methode nicht gut.
- Mit einer kleinen Spitze ein wenig einer frischen Hefenkolonie in 20 μl dest. Wasser suspendieren.
- 8,5 μl dieser Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit 16,5 μl des folgenden Mastermix mischen:

Mastermix für die Colony-PCR (pro Klon):

2,5	$\mu\text{l}$	Taq-Puffer
2,5	$\mu\text{l}$	dNTPs [2mM]
0,5	$\mu\text{l}$	Primer 1 [100 pmol/ $\mu\text{l}$ ]
0,5	$\mu\text{l}$	Primer 2 [100 pmol/ $\mu\text{l}$ ]
0,5	$\mu\text{l}$	Taq-Polymerase
10	$\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O dest.

Mit diesem Gemisch die folgende PCR durchführen:

PCR-Programm für Colony-PCR mit Hefen:

- 1) 95°C      5 min
- 2) 95°C      30 sec
- 3) 50 – 55°C 30 sec
- 4) 72°C      3 min
- 5) 72°C      3 min
- 30 Zyklen (Schritte 2 bis 4)

- Für die elektrophoretische Analyse der PCR-Produkte den gesamten PCR-Ansatz in einem 1%igen Agarosegel auftrennen.
- Mit der restlichen Suspension der Klone mit dem erwarteten PCR-Produkt eine Flüssigkultur zur DNA Isolation animpfen bzw. den Klon auf dem geeigneten Nährmedium ausstreichen.

### Colony-PCR mit Bakterien

- Eine Bakterienkolonie von der Platte abnehmen und in 25  $\mu\text{l}$  dest. Wasser suspendieren.
- 10  $\mu\text{l}$  dieser Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführen und durch wiederholtes Aufkochen und Abkühlen der Suspension die Bakterien aufbrechen:

Thermocycler Programm HEBREAK:

- 1) 96°C      5 min
- 2) 50°C      1 min 30 sec
- 3) 96°C      1 min 30 sec
- 4) 45°C      1 min
- 5) 96°C      1 min
- 6) 40°C      1 min

Während dem Aufbrechen der Bakterien das Mastermix für die anschließende PCR ansetzen:

Mastermix für die Colony-PCR (pro Klon):

2,5  $\mu$ l Taq-Puffer (enthält  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )  
 2,5  $\mu$ l dNTPs [2 mM]  
 1,5  $\mu$ l  $\text{MgCl}_2$  [25 mM]  
 0,5  $\mu$ l Primer 1 [25 pmol/ $\mu$ l]  
 0,5  $\mu$ l Primer 2 [25 pmol/ $\mu$ l]  
 0,5  $\mu$ l rekombinante Taq-Polymerase  
 7  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

- 15  $\mu$ l des Mastermix zu den 10  $\mu$ l aufgebrochene Bakteriensuspension geben
- PCR mit geeignetem PCR-Programm durchführen.
- Für die elektrophoretische Analyse der PCR-Produkte 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes in einem 1%igen Agarosegel auftrennen.
- Mit der restlichen, nicht aufgebrochenen Suspension der Klone mit dem erwarteten PCR-Produkt eine Flüssigkultur zur Plasmid-DNA Isolation animpfen.

### single-worm-lysis

- 50  $\mu$ l SWL-Puffer [2x] mit 50  $\mu$ l M9-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mischen.
- Den Deckel des Eppendorfgefäßes mit einer Schere abschneiden und die 100  $\mu$ l SWL-Puffer in den umgedrehten Deckel pipettieren.
- Ca.. 50 adulte Würmer mit einem Platinspatel von der Kulturplatte in den SWL-Puffer im Deckel überführen, dabei möglichst wenig Bakterien mit transferieren.
- Das 1,5 ml Eppendorff-Gefäß umgedreht auf den Deckel stülpen.
- Das 1,5 ml Eppendorff-Gefäß kurz zentrifugieren, um die Würmer mit dem SWL-Puffer zu pelletieren.
- 4  $\mu$ l Proteinase K (Qiagen) hinzufügen.
- 1h in einem 50°C Wasserbad inkubieren.
- Anschließend Wasserbad auf 90°C einstellen und 10 min bei 90°C inkubieren.
- Probe sofort auf Eis stellen.

<u>SWL Puffer [2x]:</u>	30 mM	Tris pH8,0
	8 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	0,7 %	NP40 (Igepal)
	0,7 %	Tween 20

## Klonierungen zur Herstellung der verwendeten Plasmide

### Monoklonale Antikörper gegen SUD-1

**Tab. A1:** Die Namen der konstruierten Expressionsvektoren und die Klonierungsstrategie für ihre Herstellung:

Name des Konstruktes	Klonierungsstrategie
pQE-30/ <i>sud-1</i> (AS 466-634)	cDNAfh- <i>SacI/XmaI</i> in pQE-30
pQE-31/ <i>sud-1</i> (AS 53-634)	cDNAfh- <i>BamHI/XmaI</i> in pQE-31
pQE-32/ <i>sud-1</i> (AS 1-1184)	cDNAfl- <i>XmaI</i> in pQE-32
pQE-32/ <i>sud-1</i> (AS 1-836)	cDNAfl- <i>XmaI/SalI</i> in pQE-32
pASK-IBA7/ <i>sud-1</i> (AS 233-486)	cDNAfl- <i>XhoI/PstI</i> in pASK-IBA7
pASK-IBA7/ <i>sud-1</i> (AS 614-850)	cDNAfl- <i>EcoRI</i> in pASK-IBA7
pASK-IBA43+ <i>sud-1</i> fl	cDNAfl- <i>KpnI/XmaI</i> in pASK-IBA43+
pASK-IBA7/ <i>sud-1</i> (AS 233-486)	cDNAfl- <i>XhoI/PstI</i> in pASK-IBA43+

Die Fragmente cDNAfl oder cDNAfh wurden mit den jeweils angegebenen Restriktionsendonukleasen aus dem Hefe-Expressionsvektor pGADT7/cDNAfl bzw. pGADT7/cDNAfh ausgeschnitten und in die jeweils angegebenen, mit den gleichen Restriktionsendonukleasen gespaltenen *E. coli* Expressionsvektoren ligiert. Für das Expressionplasmid pASK-IBA43+/*sud-1*fl wurde ursprünglich die komplette cDNA mit *XmaI* aus pGADT7/cDNAfl ausgeschnitten und in pASK-IBA43+, mit *XmaI* gespalten, ligiert. Da dabei wie bei den Yeast-Two-Hybrid Plasmiden das Offene Leseraster (ORF) nicht mehr korrekt war, musste genau wie bei den Yeast-Two-Hybrid-Plasmiden der ORF korrigiert werden. Hierzu wurde eine PCR mit CE18547 und *sud1Pr1* durchgeführt, und anschliessend wie beim Y2H beschrieben das 5'-Ende der cDNA ausgetauscht.

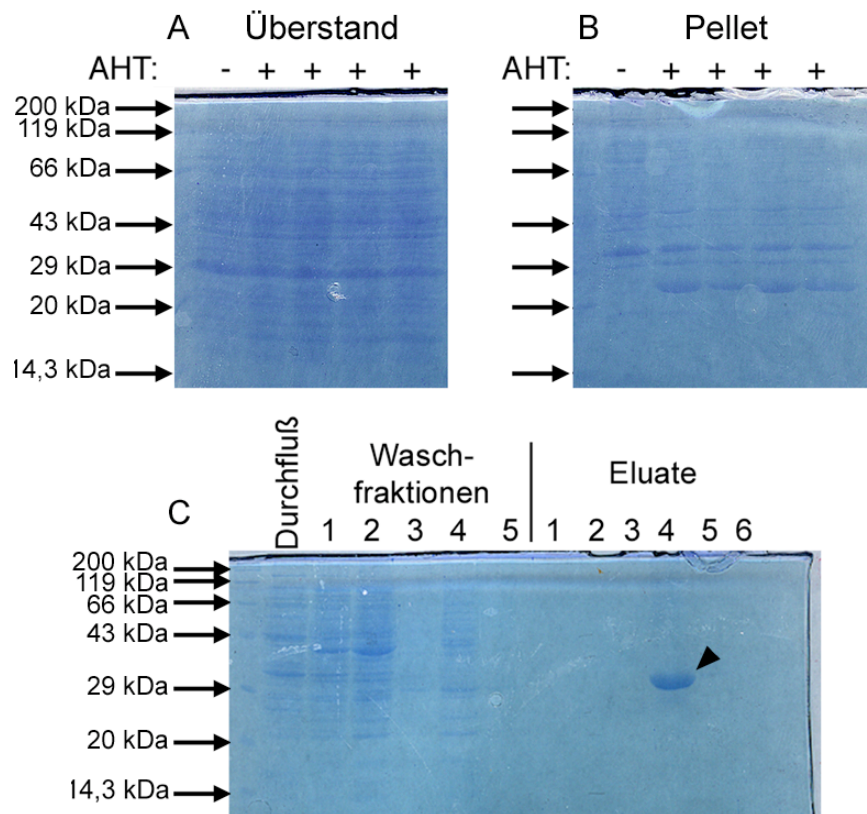
Für die Expressionsversuche wurden die korrekt ligierten Expressionsvektoren aus DH5 $\alpha$  isoliert und mit Hitzeschock in die *E. coli* Expressionsstämme XL1-Blue und BL21 transformiert.

**Tab. A2:** Die verschiedenen Konstrukte für die SUD-1 Überexpression in *E. coli* sowie die Größe des exprimierten Peptids, der *E. coli* Stamm und der Expressionserfolg.

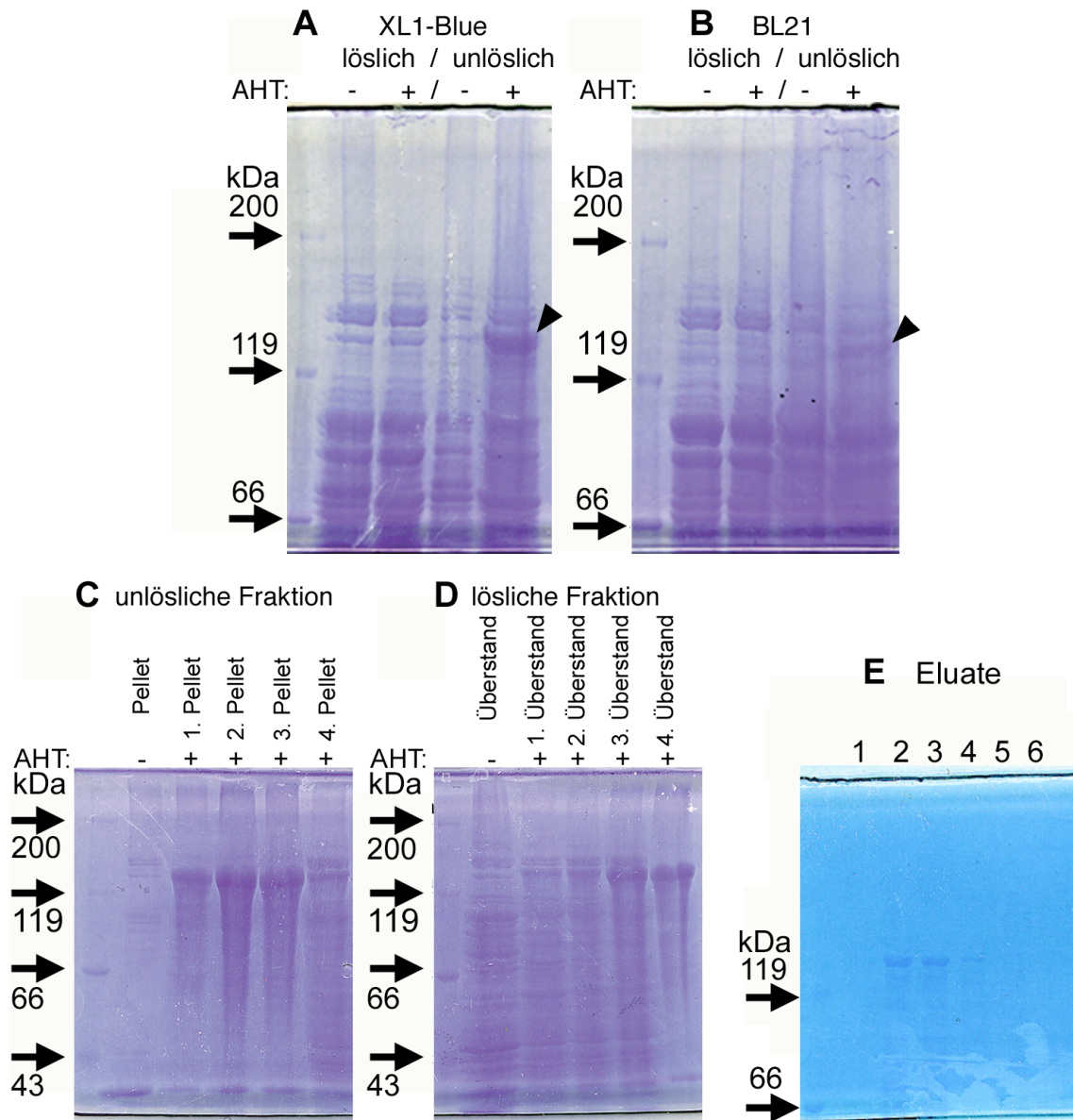
Name des Konstruktes	Klonierungsstrategie	MW des Peptides/ Proteins	<i>E. coli</i> -stamm	Expression
pQE-30/sud-1 (AS 466-634)	cDNAfh-SacI/XmaI in pQE-30	17 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pQE-31/sud-1 (AS 53-634)	cDNAfh-BamHI/XmaI in pQE-31	48 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pQE-32/sud-1 (AS 1-1184)	cDNAfl-XmaI in pQE-32	130 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pQE-32/sud-1 (AS 1-836)	cDNAfl-XmaI/SalI in pQE-32	84 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pASK-IBA7/sud-1 (AS 233-486)	cDNAfl-XhoI/PstI in pASK-IBA7	25 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pASK-IBA7/sud-1 (AS 614-850)	cDNAfl-EcoRI in pASK-IBA7	23 kDa	BL-21 XL1-Blue	- -
pASK-IBA43+/sud-1fl	cDNAfl-KpnI/XmaI in pASK-IBA43+	130 kDa	BL-21 XL1-Blue	+ +
pASK-IBA7/sud-1 (AS 233-486)	cDNAfl-XhoI/PstI in pASK-IBA43+	25 kDa	BL-21 XL1-Blue	+ +

Der Expressionsvektor pASK-IBA43+ besitzt eine zusätzliche Ribosomen-Bindestelle im Promotorbereich, welche eine Erhöhung der Expressionrate bewirkt. Zudem codiert pASK-IBA43+ zwei Epitope für die anschließende Aufreinigung: N-terminal ein Strep-tag und C-terminal ein 6xHis-tag. Das Strep-tag vermittelt eine hochspezifische Bindung an Streptactin unter sehr milden Bedingungen, wodurch das rekombinante Protein unter nativen Bedingungen sehr effizient aufgereinigt werden kann. Sowohl das 25 kDa große Peptid als auch das komplette Protein wurden jedoch nicht als lösliche Proteine im Zytoplasma der Bakterienzellen angereichert, sondern in sogenannten <inclusion bodies> eingeschlossen (Abb.A2 und A3). Demnach musste das rekombinante Peptid bzw. Protein erst unter stark denaturierenden Bedingungen gelöst werden. Dazu wurde nach der Zell-Lyse das <inclusion bodies> enthaltende Pellet in denaturierendem Puffer (6 M Guanidin-HCl, 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) resuspendiert und anschließend in einem 60°C warmen Wasserbad 30 min. unter mehrfachem starkem Vortexen inkubiert. Alle 10 min. wurde die Suspension abzentrifugiert und das Pellet in frischem Denaturierungspuffer erneut resuspendiert. Die Überstände wurden für die anschließende Aufreinigung gesammelt (Abb. A3). Der Versuch, die rekombinanten Proteine nach dieser starken Denaturierung durch Dialyse in ihre native Form zurückzuverwandeln schlug fehl, da sie bei einer schrittweisen und langsamen Reduzierung der Salzkonzentration bei 2 M Guanidin-HCl wieder ausgefallen sind. Eine Injektion der Mäuse mit in denaturierendem Lysepuffer gelösten Protein bzw. Peptid ist aus physiologischen Gründen jedoch nicht möglich, und so musste das aufgereinigte Protein/Peptid aus dem denatu-

rierenden Puffer ausgefällt werden. Das Proteinpellet wurde dann in PBS-Puffer aufgenommen, mit der Pipettenspitze möglichst gut zerkleinert und den Mäusen injiziert. Die Mäuse sind in der Lage, die kleinen Proteinpellets abzubauen und Antikörper gegen die gefällten Proteine zu bilden.



**Abb. A2:** Expression und Aufreinigung des Peptids SUD-1(233-486) aus *E. coli*. Zur Expression wurden Klone des Stammes XL1-Blue, die den Expressionsvektor pASK-IBA43+/sud-1(AS 233-486) tragen, mit Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. (A) Überstand und (B) Pellet nach der Proteinextraktion aus nicht induzierten und induzierten XL1-Blue-Zellen. Das durch Induktion exprimierte Peptid ist im unlöslichen Pellet wieder zu finden, und läuft in dem SDS-Gel aufgrund der beiden Aufreinigungs-tags etwas höher als 25 kDa. (C) Waschfraktionen und Eluate nach der His-tag-Aufreinigung mit einer Ni-NTA-Säule. Das aufgereinigte SUD-1 Peptid war im Eluat 4 wieder zu finden (Pfeilkopf).



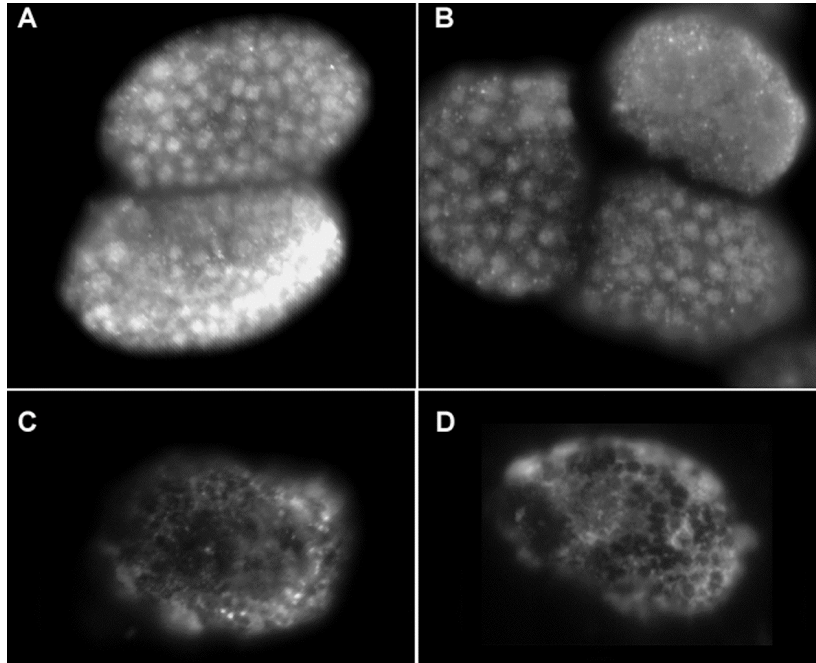
**Abb. A3:** Expression, Lösen und Aufreinigung des Proteins SUD-1 aus *E.coli*. Zur Expression wurden Klone des Stammes XL1-Blue mit dem Expressionsvektor pASK-IBA43+/sud-1fl mit Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. (A) und (B) Überstand und Pellet nach der Proteinextraktion aus nicht induzierten und induzierten XL1-Blue und BL21-Zellen. Das durch Induktion exprimierte SUD-1 ist im unlöslichen Pellet wieder zu finden (Pfeilkopf). (C) und (D) Pellets und Überstände nach dem Lösen des Proteins (s. Text). (E) Eluate nach der His-tag-Aufreinigung mit einer Ni-NTA-Säule. Das aufgereinigte SUD-1 ist in den Eluaten 2,3,4 nachweisbar.



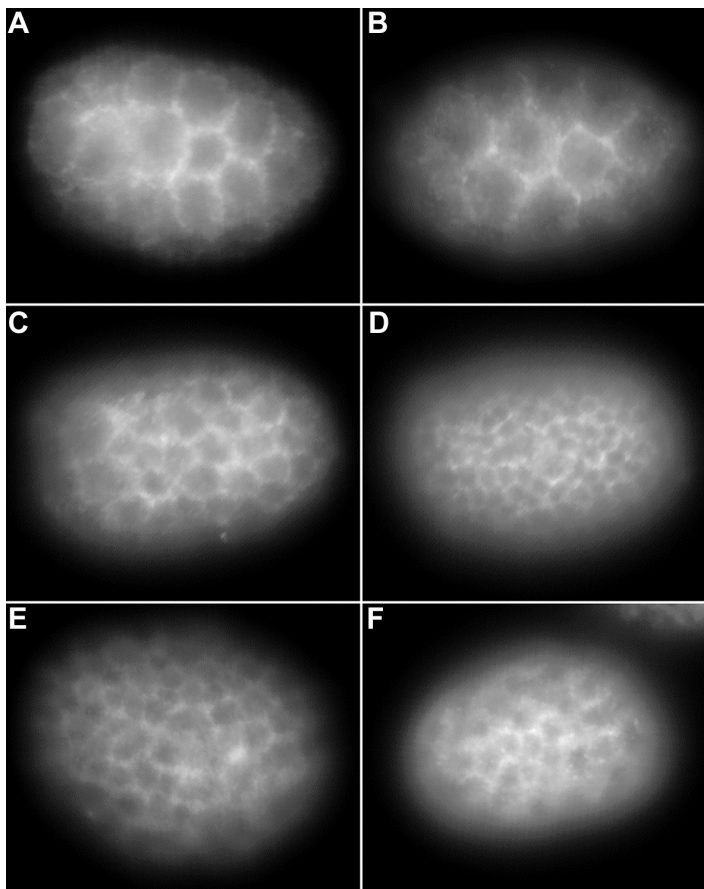
## Immunisierung mit dem Peptid SUD–1(AS 233-486)

Nach erfolgreicher Immunisierung von zwei Mäusen mit dem kurzen Peptid SUD–1(AS 233-486) und zwei unabhängigen Fusionen der Milzzellen mit den Myelomazellen konnten anfangs 97 monoklonale Antikörper produzierende Hybridomazelllinien etabliert werden. Die Spezifität der produzierten Antikörper gegen das Peptid aus SUD–1 wurde mittels ELISA mit der Spezifität gegen das HIS- und das Strep-tag (bzw. andere His- und Strep-tag fusionierte *C. elegans*-Proteine, APX–1 und CIB–3) verglichen. Es sind nur noch 13 Klone übrig geblieben, welche ein signifikantes Signal gegen das SUD–1 Peptid bei vergleichsweise geringer Reaktivität gegen die beiden tags gezeigt haben (Tab. A3). Diese 13 Klone wurden ein erstes Mal kloniert und anschließend wieder mit ELISA gegen das Peptid getestet. Bei allen Klonen war nach der ersten Klonierung das ELISA-Signal deutlich stärker als vorher und sie wurden ein zweites Mal kloniert. Nach der zweiten Klonierung wurden dann zusätzlich ELISA-Analysen gegen das vollständige SUD–1 Protein durchgeführt. Alle 13 Klone zeigten eine Spezifität gegen das komplette SUD–1 Protein und wurden daher ein drittes Mal kloniert. Im Anschluss an diese dritte Klonierung wurden die ELISA gegen das SUD–1 Peptid wiederholt und des Weiteren Western Blots gegen das Peptid, das komplette SUD–1 Protein sowie gegen die beiden tags durchgeführt. Nur die Klone 3H7 und 1D12 aus der ersten Fusionierung, die im Western Blot sowohl gegen das Peptid als auch gegen das komplette Protein spezifische Antikörper produzierten, zeigten nach den Tests im ELISA und in den Western Blots gegen das Peptid und das komplette Protein und zusätzlich in Antikörperfärbungen ein eindeutiges Signal. Bei diesen Antikörpern wurde die Subklasse IgM festgestellt. Um die Antikörperfärbungen zu optimieren und die Spezifität der Antikörper in Immunfluoreszenzen zu prüfen, wurden Wildtyp Embryonen sowie Embryonen von *sud–1* homozygot mutierten Hermaphroditen mit Paraformaldehyd fixiert und gefärbt (Abb. A4).

Die Immunfärbungen erzielten mit dem Antikörper 1D12 keine eindeutigen Ergebnisse. Der Antikörper färbt im Wildtyp schwach Zytoplasma oder Kerne und in der *sud–1* Mutante *t1201* die Zellmembran. Unter der Annahme, dass es sich bei den Allelen von *sud–1* um <loss of function>-Mutationen handelt, würde man erwarten, dass der richtige Antikörper in den mutierten Embryonen entweder gar nicht oder sehr viel schwächer das gleiche Kompartiment wie im Wildtyp anfärbt. Dies bedeutet, dass der Antikörper 1D12 das SUD–1 Protein scheinbar nicht spezifisch erkennt und daher nicht verwendet werden sollte, um die zelluläre Lokalisierung des SUD–1 Proteins zu untersuchen.



**Abb. A4:** Antikörperfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper 1D12 und PFA fixierten Embryonen. (A) und (B) Wildtyp Embryonen, (C) und (D) Embryonen von Hermaphroditen homozygot für das *sud-1* Allel *t1201*. Der primäre Antikörper (1D12) wurde 1:5 und der sekundäre Antikörper (Alexa 568 $\alpha$ IgM) wurde 1:200 in TBST verdünnt. Der Antikörper färbt im Wildtyp die Zellkerne und in der Mutante die Zellmembran.



**Abb. A5:** Antikörperfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper 3H7 und PFA fixierten Embryonen. (A) und (B) frühe Wildtypembryonen, (C) und (D) späte Wildtypembryonen, (E) und (F) Embryonen von Hermaphroditen homozygot für das *sud-1* Allel *1237*. Der primäre Antikörper (3H7) wurde 1:5 und der sekundäre Antikörper (Alexa 568 $\alpha$ IgM) wurde 1:200 in TBST verdünnt. Der Antikörper färbt sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante die Zellmembranen.

Der Antikörper 3H7 hingegen färbte im Wildtyp die Zellmembranen in frühen und späten Embryonen. In Embryonen von Hermaphroditen, die homozygot für das *sud-1* Allel *t1237* waren konnte jedoch ebenfalls eine Zellmembran assoziierte Lokalisation festgestellt werden (Abb. A5). In der Mutante sollte jedoch kein (oder kaum) Genprodukt des Gens *sud-1* vorliegen. Die Spezifität des Antikörpers konnte also mittels Antikörperfärbungen nicht eindeutig gezeigt werden.

### **Immunisierung mit dem kompletten Protein SUD-1**

Ein zweiter Ansatz für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen SUD-1 war die Immunisierung von einer Maus mit dem kompletten rekombinanten Protein SUD-1. Von dieser Immunisierung wurden erst 60 Hybridomazelllinien erhalten, die Antikörper gebildet haben. Nach den schon beschriebenen Tests sind letztlich vier Klone übrig geblieben, die dreimal kloniert wurden (Tab. A4). Ein Klon davon (5B9) war in allen ELISA- und Western Blot-Tests als einziger eindeutig positiv. Dieser Klon produziert ebenfalls Antikörper des Typs IgM.

### **Herstellung monoklonaler muriner Antikörper gegen SUD-1**

Die Arbeiten mit den Mäusen zur Gewinnung von monoklonalen Antikörper gegen SUD-1 und die darauf folgenden ELISA- und Western Blot-Screens wurden in Zusammenarbeit mit der Servicegruppe der Arbeitsgruppe Zellbiologie der TU Braunschweig (Prof. B.M. Jokusch) und dort von Frau Sabine Buchmeier durchgeführt. An dieser Stelle werden lediglich die wichtigsten Daten zur Immunisierung der Mäuse sowie der Etablierung der Hybridomazelllinien aufgelistet.

Adjuvans:	Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-Ly <sub>4</sub> -OH, Firma Calbiochem (Lipoheptapeptid, abgeleitet aus dem immunologisch aktiven N-Terminus von bakteriellen Lipoproteinen)
Versuchstiere:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BALB/c Maus, 7 Wochen altes Weibchen (bei dem Immunogen <i>SUD-1</i>, full length protein, rekombinant mit HIS-und STREP-TAG)</li> <li>• 2 BALB/c Mäuse, 7 Wochen alte Weibchen (bei dem Immunogen <i>SUD-1</i>, AS 233 - 486, rekombinant mit HIS-und STREP-TAG)</li> </ul>
Fusionszelllinie:	FOX-NY/NS-1; BALB/c Myeloma
Fusionsreagenz:	PEG/DMSO, Firma Sigma
Selekt. Medium:	Hypoxanthin-Azaserin in DMEM
Anzuchtmedium:	DMEM mit 10% FCS

## **Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Galectine**

Die verwendeten Peptide wurden von dem Service <peptide design> vorgeschlagen und synthetisiert. Die Immunisierungen wurden ebenfalls von der Firma eurogentech® vorgenommen.

## **Antikörperfärbung mit Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung:**

### **PFA lösen**

- 0,25 g PFA in ein Reagenzglas einwiegen.
- 1-2 Tropfen 0,5-1M NaOH dazuträufeln.
- 500 µl H<sub>2</sub>O hinzufügen.
- Reagenzglas in einen Heizblock stellen bis sich das PFA gelöst hat.
- Die PFA-Lösung mit 4,5 ml PBS versetzen und sofort auf Eis stellen.

### **Teflon-Slides für die Antikörperfärbung vorbereiten**

- Teflon-Slides mit Ethanol abwischen und zum Erwärmen auf einen Heizblock legen.
- Poly-L-Lysin-Lösung (0,25 mg/ml) ansetzen .
- Die erwärmten Teflon-Slides kurz abkühlen lassen und dann mittels eines Gummischwamms durch gleichmäßiges Bestreichen mit dem Poly-L-Lysin beschichten.
- Teflon-Slides zum Nachtrocknen kurz auf den Heizblock legen, dann an der Luft abkühlen lassen und die Embryonen darauf pipettieren.

### **PFA-Fixierung der Embryonen auf Teflon-Slides**

- Mit einer Wasserstrahlpumpe den Wassertropfen auf den Embryonen absaugen und gleichzeitig von der anderen Seite des Wells 5 µl PFA-Lösung auf die Embryonen pipettieren (die Embryonen dürfen während des ganzen Protokolls niemals trockenfallen!).
- Noch zweimal die Flüssigkeit über den Embryonen absaugen und 5 µl PFA-Lösung auf die Embryonen pipettieren.
- Vorsichtig ein großes Deckglas (1,5 mm dick, 24 x 60 mm) so auf das Teflon-Slide legen, dass es alle mit Embryonen versehenen Wells bedeckt und am rechten Rand etwas übersteht.
- Die so in PFA-Lösung eingedeckelten Embryonen 25 min bei RT inkubieren.
- Methanol und Aceton in einer Glasküvette bei -20°C vorkühlen.
- Metallblock in flüssigem Stickstoff vorkühlen.
- Nach den 25 min Inkubation die Teflon-Slides mit dem Deckglas nach oben mindestens 10 min auf den eiskalten Metallblock in flüssigem Stickstoff legen (das Teflon-Slide sollte keinen direkten Kontakt zum flüssigen Stickstoff haben).

- Das Teflon-Slide schnell vom Metallblock nehmen, herumdrehen und schnell das Deckglas abschlagen.
- Teflon-Slide sofort 5 min in eiskalten Methanol stellen.
- Teflon-Slide schnell 5 min in eiskalten Aceton stellen.
- Teflon-Slide an der Luft trocknen, bis sämtliches Aceton verdampft ist.
- Mit der Antikörperfärbung fortfahren oder Teflon-Slides bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

### **Antikörperfärbung**

- Teflon-Slide mindestens 10 min in Glasküvette mit TBS-T stellen.
- TBS-T mit der Wasserstrahlpumpe absaugen und schnell  $4\ \mu\text{l}$  primären Antikörper auf die Embryonen pipettieren.
- Das Präparat 3 h bei RT oder ü.N. bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtekammer inkubieren.
- Teflon-Slide mindestens 10 min in Glasküvette mit TBS-T stellen.
- TBS-T mit der Wasserstrahlpumpe absaugen und schnell  $4\ \mu\text{l}$  sekundären Antikörper auf die Embryonen pipettieren.
- Das Präparat 3 h bei RT oder ü.N. bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtekammer inkubieren.
- Teflon-Slide mindestens 10 min in Glasküvette mit TBS-T stellen.
- TBS-T mit der Wasserstrahlpumpe vollständig entfernen und  $4\ \mu\text{l}$  Mountingpuffer an den linken Rand der entsprechenden Wells pipettieren.
- Embryonen mit Deckglas (1 mm dick, 24x50 mm) luftblasenfrei eindecken, indem das Deckglas auf der linken Seite aufgesetzt und langsam abgesenkt wird, sodass der Mountingpuffer langsam über die entsprechenden Wells gezogen wird.
- die so eingedeckelten Antikörperfärbungen sind bei  $4^{\circ}\text{C}$  mehrerer Monate haltbar.

**Tab. A3:** Spezifitätstest der Antikörper aus der Immunisierung mit dem Peptid SUD–1(AS233-486).

1. Fusion												
Klon	ELISA I			ELISA II			ELISA	BLOT	BLOT	BLOT	BLOT	IF
	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag	HIS-tag	Strep-tag	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 1.Klonierung	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 2.Klonierung	SUD full length +His- und Strep-tag	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 3.Klonierung	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag	HIS-tag+ STREP-tag	SUD full length +His und Strep-tag	Proteinextrakt aus <i>C. elegans</i> Würmern und Embryonen	Wildtyp
3A10	0.453	0.040	0.025	0.224	0.700	0.093	0.309	schwach	schwach	Negativ	Negativ	Muskeln Saumz. Desmosomen
<b>3H7</b>	<b>0.297</b>	<b>0.044</b>	<b>0.024</b>	<b>0.175</b>	<b>0.294</b>	<b>0.284</b>	<b>0.522</b>	<b>Positiv ?</b>	<b>negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Positiv</b>	<b>Membran</b>
5G9	0.353	0.039	0.011	0.097	0.126	NN	0.250	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Kerne +
7A9	0.227	0.048	0.092	0.150	0.413	0.015	0.048	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Darm Pharynx-cluster
1D8	0.355	0.043	0.034	0.053	0.104	0.039	0.184	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ(?)	Positiv
1D12	0.339	0.026	0.012	0.066	0.113	0.367	0.271	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	Membran
4B9	0.110	0.049	0.021	0.043	0.138	NN	0.190	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv
2E11	0.182	0.020	0.022	0.114	0.583	0.051	0.286	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ	Cyt.opl. Membran
4F6	0.354	0.062	0.021	0.084	0.198	NN	0.093	Negativ	Negativ	Unspezifisch	Unspezifisch	Zytopl.
5E12	0.274	0.028	0.031	0.215	0.558	0.036	0.322	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv (?)	Membran
2. Fusion												
Klon	ELISA I			ELISA II			BLOT			BLOT	BLOT	ELISA
	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag	APX-1+ His und Strep-tag	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 1.Klonierung	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 2.Klonierung	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag 3.Klonierung	CIB-3- +His und Strep-tag	SUD AS 233-486 +His und Strep-tag	His und Strep-tag	SUD AS 233-486+His und Strep-tag	SUD full length+His und Strep-TAG	Proteinextrakt aus <i>C. elegans</i>	Apx-1-+His und Strep-TAG
1D11	1.085	0.047	0.529	0.598	0.750	N.N.	+	negativ	++	?	((+))	NN
3D2	<b>0.773</b>	<b>0.040</b>	<b>0.609</b>	<b>0.835</b>	<b>0.744</b>	<b>0.055</b>	<b>+++</b>	<b>negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>0.068</b>
5B5	0.248	0.047	0.347	0.482	0.585	0.108	Negativ	negativ	+	NN	+++	0.118

**Tab. A4:** Spezifitätstest der Antikörper aus der Immunisierung mit dem kompletten SUD–1 Protein.

Klon	ELISA			ELISA II			BLOT			ELISA III		
	SUD full length + HIS und Strep-tag	Strep-tag	HIS-tag	SUD full length + HIS und Strep-tag 1.Klonierung	SUD full length + HIS und Strep-tag 2.Klonierung	SUD full length + HIS und Strep-tag 3.Klonierung/ Reklonierung	SUD full length + HIS und Strep-tag	Wurmextrakt aus <i>C. elegans</i>	HIS+Strep-tag	Apx-1-+His und Strep-tag ELISA	Cib-3-+His und Strep-tag ELISA	Sub-klasse
4D4	0.071	0.031	0.051	0.241	0.081	0.376/ 0.324	Positiv	negativ	negativ	N.N.	0.125	N.N.
5B9	0.102	0.021	0.114	0.229	0.161	0.472/ 0.351	(+)/Positiv, unspez.	positiv	unspezifisch	N.N.	0.118	IgM
6H8	0.134	0.048	0.075	0.245	0.316	0.733/ 0.687	Positiv/Positiv unspezifisch	Positiv (?)	unspezifisch	0.149	0.277	N.N.
8C1	0.114	0.031	0.038	0.283	0.153	0.223/ 0.283	Negativ/negativ	negativ	N.N.	N.N.	0.083	N.N.



### SUD–1-TAP-tag-Fusionsprotein

Zuerst wurde eine cTAP-Kan<sup>R</sup>-Cassette konstruiert, bei der die Sequenz des TAP-tag vor dem Promoter des Kanamycin-Resistenzgens in den Vektor pHE601 ligiert wurde. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern CE2064 und CE2065 und dem Plasmid pFA6a als Template das TAP-tag amplifiziert und das PCR-Produkt zum Sequenzieren in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Anschließend wurde das TAP-tag mit den Restriktionsendonucleasen *SpeI* und *BglII* aus dem Vektor pCR4-TOPO ausgeschnitten und über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in den ebenso gespaltenen Vektor pHE601 ligiert. Mit dem dadurch entstandenen Vektor pHE601-cTAP wurde in einer weiteren PCR mit den Primern CE2153 und CE2154 die cTAP-Kan<sup>R</sup>-Cassette amplifiziert, das 2,3 kb große Produkt in pCR4-TOPO kloniert, sequenziert und anschließend mit *NotI* und *ApaI* ausgeschnitten und in das ebenfalls mit *NotI* und *ApaI* gespaltene Plasmid pGEM3/FM6.9-NA ligiert. Das Plasmid pGEM3/FM6.9-NA codiert die genomische Sequenz des Gens *sud–1*, in dem in Vorarbeiten (Müller M., Diplomarbeit) direkt upstream des STOP Codons eine *ApaI* Restriktionsschnittstelle und direkt downstream des STOP Codons eine *NotI* Restriktionsschnittstelle eingesetzt wurde. Dieses Konstrukt, pGEM3/FM6.9-cTAP, wurde mit *SaI* gespalten, sodass ein lineares Fragment von 3,9 kb erhalten wurde, welches vor der cTAP-Kan<sup>R</sup>-Cassette 1355 bp homolog und hinter der cTAP-Kan<sup>R</sup>-Cassette 300 bp homolog zu der genomischen Sequenz von *sud–1* codiert. Mit diesem linearen DNA-Fragment wurden Hefen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* transformiert, welche ein YAC beinhalten, auf dem *sud–1* codiert ist (Y55H12).

### Yeast-Two-Hybrid Screen (Y2H)

Für den Y2H-Screen wurden die komplette SUD–1 codierende cDNA (<full length>, cDNAfl), die erste Hälfte (<first half>, cDNAfh) und die zweite Hälfte (<second half>, cDNAsh) jeweils in den Vektor mit der aktivierenden Domäne pGADT7 und in den Vektor mit der DNA bindenden Domäne pGBKT7 subkloniert. In Vorarbeiten wurden dafür die komplette *sud–1* codierende cDNA (cDNA full length, cDNAfl) sowie die erste Hälfte (cDNA first half, cDNAfh) und die zweite Hälfte (cDNA second half, cDNAsh) über die Restriktionsschnittstelle von *Cfr9I* (= *XmaI*) in die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 kloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden pGBKT7/cDNAfl, pGADT7/cDNAfl, pGBKT7/cDNAfh, pGADT7/cDNAfh und pGBKT7/cDNAsh, pGADT7/sh genannt. Da bei diesen Klonierungen jedoch das offene Leseraster der cDNAs verschoben wurde, mussten für die Durchführung des Yeast-2-Hybrid-Screen erst die offenen Leseraster korrigiert werden. Dazu wurden mit den Primern CE1734 und sud1Pr1 (cDNAfl und cDNAfh) PCR-Reaktionen durchgeführt, bei denen das 5'-Ende der cDNAs mit einer *NdeI* Schnittstelle versehen wurde. Das 450 bp große PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR<sup>®</sup>4 Blunt-TOPO subkloniert und mit den Primern CE041 und CE042 sequenziert. Anschließend wur-

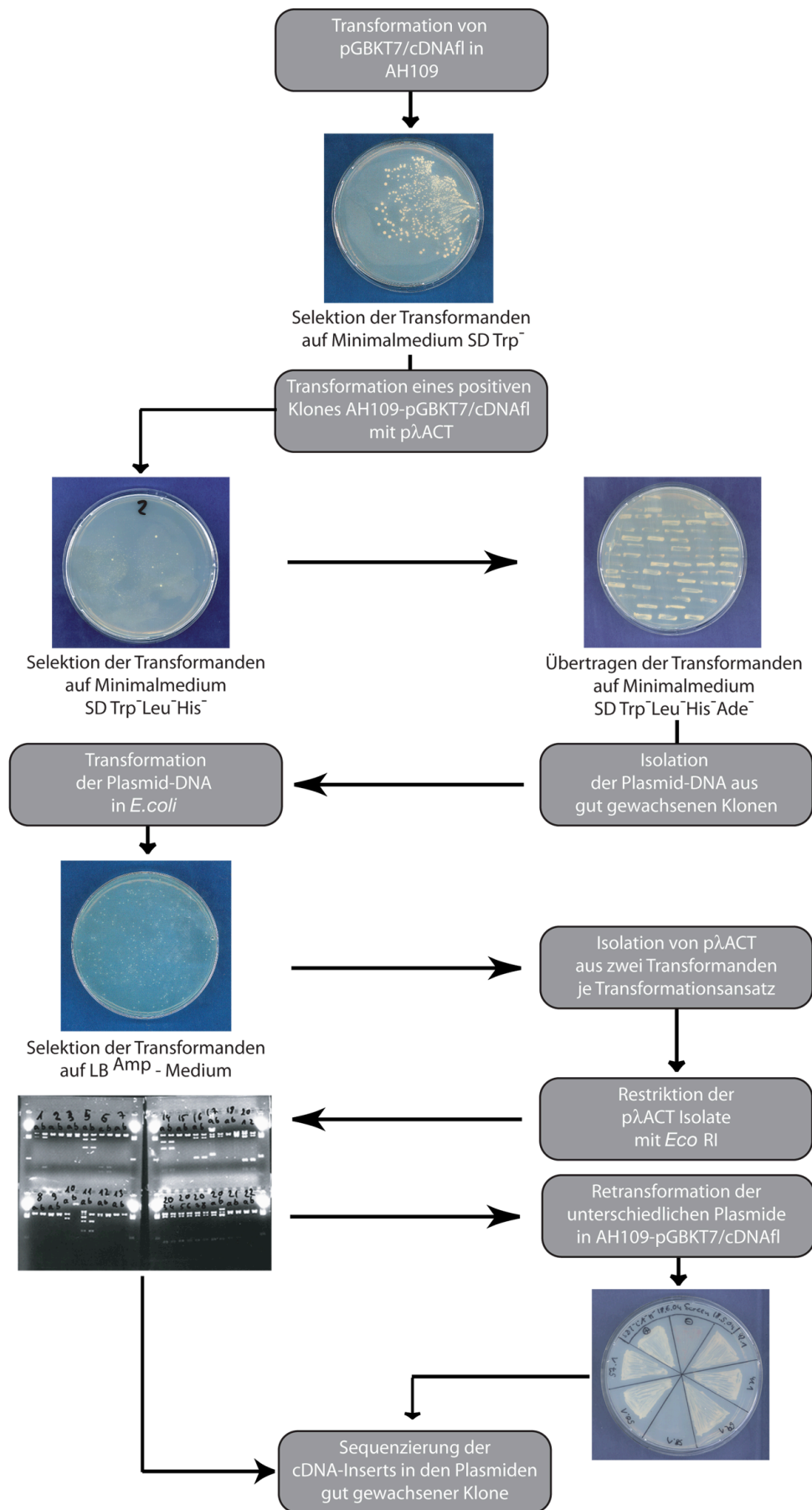
den die ersten 150 bp am 5'-Ende der cDNAs mit *Nde* I und *Bam* HI aus dem Vektor pCR®4 Blunt-TOPO ausgeschnitten und in die ebenfalls mit *Nde* I und *Bam* HI geschnittenen Vektoren pGBKT7/cDNAfl und pGBKT7/cDNAfh ligiert. Genauso wurde mit den Konstrukten pGADT7/cDNAfl und pGADT7/cDNAfh das offene Leseraster korrigiert. Die zweite Hälfte der *sud-1* cDNA (cDNAsh) wurde mit den Primern CE1840 und CE946 und dem *sud-1* cDNA kodierenden Klon YK43B10 als Template mittels PCR amplifiziert, zum sequenzieren in den Vektor pCR4-TOPO subkloniert und anschließend über die beiden Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Xma* I in die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 kloniert. Anschließend die entsprechenden Vektoren (pGADT7/cDNAfl, pGADT7/cDNAfh, pGADT7/cDNAsh, pGBKT7/cDNAfl, pGBKT7/cDNAfh und pGBKT7/cDNAsh) jeweils in den Hefestamm AH109 transformiert.

Die Durchführung des Screens ist in Abbildung A6 dargestellt. Es wurden Zellen des *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes AH109 mit dem Vektor pGBKT7/cDNAfl transformiert. Dieser Vektor codiert zur Selektion die Aminosäureauxotrophie für Tryptophan, um die Transformanden „AH109-pGBKT7/cDNAfl“ auf Agarplatten ohne Tryptophan zu identifizieren. In einer ersten Transformationsrunde wurde ein Klon „AH109-pGBKT7/cDNAfl“ mit der *C. elegans*-cDNA-Bank in dem Vektor p $\lambda$ ACT-RB1 transformiert. p $\lambda$ ACT-RB1 codiert die Aminosäureauxotrophie für Leucin, um auf Platten ohne Tryptophan und ohne Leucin die Hefen zu selektieren, die beide Vektoren beinhalten.

AH109 kodiert zur Reduzierung falsch positiver Klone vier verschiedener Reportergene unter der Kontrolle von verschiedenen GAL-UAS und GAL-Promotoren:

- GAL1 UAS + GAL1 TATA + *HIS3*
- GAL2 UAS + GAL2 TATA + *ADE2*
- MEL1 UAS + MEL1 TATA + *lacZ* ( $\beta$ -gal)
- MEL1 UAS + MEL1 TATA + MEL1 ( $\alpha$ -gal)

Wenn SUD-1 mit einem in der cDNA Bank codierten Protein interagiert, so wird die Expression des *HIS3*-Gens in der Hefe aktiviert, und die Hefen können auf Medium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin wachsen. Nach der ersten Transformationsrunde wurden die Hefen gleich auf Minimalmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin ausplattiert, sodass nur die Hefeklone wachsen konnten, welche interagierende Proteine kodieren Vektoren beinhalten. Zur Bestimmung der Transformationsrate wurde ein kleines Volumen des Transformationsansatzes (40  $\mu$ l) auf Medium ohne Tryptophan und ohne Leucin plattiert. Wird dem Medium zusätzlich zum Histidin auch das Adenin entzogen, so kann durch die zusätzliche Selektion auf das *ADE2*-Reportergen die Stringenz der positiven Interaktionen erhöht werden. Die Anzahl falsch positiver Klone wurde reduziert, indem die Hefeklone, die nach der ersten Transformationrunde als positiv identifiziert wurden, auf Platten ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin übertragen wurden. Die Klone auf den Platten zur Berechnung der Transformationsrate wurden ebenfalls auf Minimalmedium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin gestempelt.



**Abb. A6:** Schematische Darstellung zur Durchführung des Y2H-Assay. Erläuterungen siehe Text.

Aus den Klonen, die ohne Typtophan, Leucin, Histidin und Adenin wachsen konnten, wurden die beiden Expressionsvektoren (pGBKT7/cDNAfl und p $\lambda$ ACT-RB1) isoliert und in *E. coli* transformiert. Die *E. coli*-Transformanden wurden auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert, um auf den cDNA-Bank-Vektor p $\lambda$ ACT-RB1 zu selektieren. Anschließend wurden die cDNA-Bank-Vektoren wieder aus den *E. coli* isoliert und mit der Restriktionsendonuclease *Eco*RI geschnitten. Mit dieser Restriktion konnte gezeigt werden, dass ein positiver Hefeklon mehrere unterschiedliche cDNA-Bank-Vektoren beinhaltet. Denn nach der Behandlung der Plasmid-DNA mit *Eco*RI aus mehreren *E. coli*-Transformanden von einem Transformationsansatz wurden im Agarosegel mehrere unterschiedliche Bandenmuster sichtbar. Um den cDNA-Bank-Vektor zu identifizieren, der in dem positiven Hefeklon den eigentlichen Interaktionspartner kodiert, wurde von allen unterschiedlich geschnittenen Plasmid-DNA-Isolaten aus *E. coli* eine Probe in einer zweiten Transformationsrunde ein zweites Mal in die Hefe AH109-pGBKT7/cDNAfl retransformiert und auf Platten ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin ausplattiert. Nur die Hefeklone, die nach der Retransformation noch auf diesem Minimalmedium wachsen konnten, wurden letztendlich als positiv gewertet. Die entsprechende Plasmid-DNA wurde sequenziert, um das mit SUD-1 interagierende Protein zu identifizieren.

## **Yeast-Two-Hybrid, Transformation von Hefen**

Für den Screen wurde von der Firma deVGen eine mit oligo-dt Primern hergestellte cDNA-Bank aus *C. elegans* (p $\lambda$ ACT-RB1) und eine mit zufälligen Primern hergestellte cDNA-Bank aus *C. elegans* (p $\lambda$ ACT-RB2) zur Verfügung gestellt. Für den Screen wurde die cDNA-Bank p $\lambda$ ACT-RB1 und die Vektoren und Hefestämme aus dem dem MATCHMARKER GAL4 Two-Hybrid System 3 der Firma CLONTECH verwendet. Um eine verbesserte Transformationsrate zu erzielen, wurde das Hefe-Transformationsprotokoll wie unten beschrieben geändert.

### **Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte**

1. Small Scale Hefetransformation: pGBKT7/gene of interest in AH109 (Selektion der Transformanden auf SD Trp<sup>-</sup>)
2. cDNA-Bank-Transformation (Small Scale) in AH109+pGBKT7/gene of interest (Selektion der Transformanden auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> bzw SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> für die Transformationsrate)
3. Transformationsrate bestimmen, Anzahl der gescreenten Klone ausrechnen
4. deutlich gewachsene Klone ( $\geq 1$  mm Durchmesser) auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> ausstreichen bzw Klone von SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> stempeln
5. doppelte Charge elektrokompetente DH5 $\alpha$  herstellen
6. Plasmidisolation aus Hefen
7. Transformation der Hefepasmide in elektrokompetente DH5a (Selektion der Transformanten auf cDNA-Bankplasmid mit Ampizillin)
8. Plasmidisolation aus Bakterienklonen (Minipreps)

9. Retransformation der isolierten Plasmide in AH109+pGBKT7/gene of interest (Selektion der Transformanten auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>)
10. positive Transformanten nach Retransformation auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> ausstreichen
11. die Plasmide sequenzieren, bei denen die Hefen nach der Retransformation auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> gewachsen sind.

### **Small Scale Hefetransformation:**

pGBKT7/gene of interest in AH109 (Selektion der Transformanten auf SD Trp<sup>-</sup>)

Die Hefezellen stets vorsichtig handhaben, nicht vortexen und vorsichtig mit abgeschnittener Spitze pipettieren.

1. Vorkultur: (morgens): 3 ml YPD oder SD werden mit 2-3 Kolonien (2-3 mm Durchmesser) angeimpft und bei 30°C schüttelnd für 1 Tag inkubieren. Durch hartes Vortexen des frisch angeimpften Mediums wird das Suspendieren der Hefezellen verbessert und dadurch ein besseres Wachstum erreicht.

2. Vorkultur: (abends): Zu der ersten Vorkultur werden 50 ml YPD oder SD hinzugegeben und über Nacht schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis die  $OD_{600} > 1,5$  ist.

Hauptkultur: (am nächsten Tag): 30 ml der zweiten Vorkultur werden in 300 ml YPD oder SD aufgenommen ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ) und schüttelnd bei 30°C inkubiert, bis die  $OD_{600} = 0,4 - 0,6$  beträgt.

Danach wie folgt fortfahren:

- Die Hefezellen werden in einem großen Hefe-Transformations-Glasröhrchen 5 min lang bei 1000 x g und RT abzentrifugiert.
- Die Zellen in H<sub>2</sub>O dest. resuspendieren und erneut 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Das Pellet in 1,5 ml frischem und sterilem 1xTE/1xLiAc auflösen und 1 h bei 30°C inkubieren.
- Heringsperma DNA in kochendem Wasser 5 min aufkochen und schnell auf Eis abkühlen.
- 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg Heringsperma DNA in einem sterilen 2 ml Eppendorfgefäß mischen (max. 10 µl Plasmid DNA u. 10 µl Heringsperma DNA).
- 100 µl kompetente Hefezellen hinzufügen.
- 600 µl steriles PEG/LiAc hinzufügen und durch Invertieren des Eppendorfgefäßes mischen.
- 1 h bei 30°C schüttelnd inkubieren.
- 70 µl DMSO hinzufügen und durch Invertieren des Röhrchens mischen.

- 30 min bei 30°C schüttelnd inkubieren, Wasserbad einschalten und auf 42°C einstellen.
- 15 min Hitzeschock mit den Hefen bei 42°C machen und Platten vorwärmen.
- Nach dem Hitzeschock Zellen 1-2 min auf Eis kühlen.
- Gekühlte Zellen mit 780  $\mu$ l 1xTE 1:1 verdünnen.
- 20  $\mu$ l der Zellen auf geeignetem SD Medium vorsichtig ausplattieren und 3 Tage bei 30°C inkubieren.

### **cDNA-Bank-Transformation (Small Scale) in AH109+pGBKT7/gene of interest:**

s.o., es können pro Small Scale Transformation 0,2  $\mu$ g cDNA-Bank eingesetzt werden => bessere Effizienz

am Ende des Transformationsprotokolls die Transformationsansätze in 300  $\mu$ l-Portionen auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> ausplattieren, für die Bestimmung der Transformationsrate 20  $\mu$ l auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> ausplattieren

### **Transformationsrate bestimmen, Anzahl der gescreenten Klone ausrechnen**

Die Transformationsrate berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$R = (\text{cfu} \times V_g) / (V_p \times F \times M)$$

Dabei bedeuten:

R = Transformationsrate

$V_p$  = plattiertes Volumen ( $\mu$ l)

cfu = Anzahl der Kolonien

F = Verdünnungsfaktor

$V_g$  = gesamtes Transformationsvolumen ( $\mu$ l)    M = eingesetzte Menge DNA ( $\mu$ g)

**deutlich gewachsene Klone** ( $\geq 1$  mm Durchmesser) als einen 1 cm langen Strich auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> ausstreichen bzw Klone von SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> stempeln.

Die ausgestrichenen Klone 3 Tage wachsen lassen, um genug Masse zur Plasmidisolierung zu erhalten.

### **Elektrokompetente DH5 $\alpha$ herstellen:**

(doppelte Charge)

- 2 x 60 ml LB-Medium in jeweils einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer frischen Einzelkolonie DH5 $\alpha$  animpfen und bei 37°C ü.N. schütteln.
- Jeweils 12,5 ml der Vorkulturen in 250 ml LB-Medium in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben animpfen und bei 37°C schütteln, bis OD<sub>600</sub> = 0,35-0,4 ist.
- Kolben sofort 15-30 min in ein Eisbad stellen und gelegentlich schwenken, damit die Kultur so schnell wie möglich abkühlt.
- Parallel dazu Zentrifugenröhrchen auf Eis und den Sorvall GSA Rotor durch Zentrifugieren bei -5°C für 10 min vorkühlen.
- Zellen im Sorvall GSA-Rotor bei 2500 upm und 4°C 15 min abzentrifugieren.
- Überstand abgießen und Pellet in 84ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest. suspendieren.

- Zellen im Sorvall GSA-Rotor bei 2500 upm und 4°C 20 min abzentrifugieren.
- Überstand abgießen und Pellet in 63 ml eiskaltem 10% Glycerin suspendieren.
- Zellen im Sorvall GSA-Rotor bei 2500 upm und 4°C 20 min abzentrifugieren.
- Überstand abgießen und Pellet in 5 ml eiskaltem 10% Glycerin suspendieren.
- Zellen im Sorvall GSA-Rotor bei 2500 upm und 4°C 20 min abzentrifugieren.
- Überstand abgießen und restliches Glycerin mit 1 ml Pipette absaugen.
- Pellet in 1 ml eiskaltem GYT-Medium suspendieren (vorsichtig schütteln, nicht vortexen oder pipettieren).
- OD<sub>600</sub> einer 1:100 Verdünnung der Zellsuspension messen und Zellsuspension auf  $2 \times 10^{10} - 3 \times 10^{10}$  Zellen/ml mit eiskaltem GYT Medium verdünnen.
- OD<sub>600</sub>  $\approx 2,5 \times 10^8$  Zellen/ml.
- 40  $\mu$ l Aliquots der Zellsuspension in eiskalte 0,5 ml Eppendorfgefäße abfüllen und in flüssigem Stickstoff einfrieren, dann bei -80°C lagern.

### Plasmidisolation aus Hefen:

- Die Hefekolonie von der Platte abkratzen und in 50  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O dest. in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß resuspendieren.
- 10  $\mu$ l Lyticase (5 U/ $\mu$ l) hinzufügen und hart vortexen.
- 30-60 min bei 37°C und 200-250 upm inkubieren.
- 10  $\mu$ l 20% SDS hinzufügen und 1 min hart vortexen.
- Die Zellen einmal bei -20°C gefrieren, auftauen und nochmals vortexen.
- Das Probenvolumen mit TE pH 7,0 auf 200  $\mu$ l einstellen (=130  $\mu$ l).
- 200  $\mu$ l PCIA (25:24:1) hinzufügen.
- 5 min hart vortexen.
- Die Probe 10 min bei 14.000 upm zentrifugieren.
- Die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- 8  $\mu$ l 10M NH<sub>4</sub>Ac und 500  $\mu$ l 95-100% Ethanol hinzufügen.
- 1 h in einem Trockeneis/Ethanol-Bad (oder bei -70°C) inkubieren.
- Die Probe erneut 10 min bei 14.000 upm zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Pellet trocknen.
- Das Pellet in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest. resuspendieren.
- 3-7  $\mu$ l der resuspendierten DNA mittels Elektroporation in kompetente *E. coli* transformieren oder die Plasmid-DNA bei -20°C lagern.

### Transformation der Hefepasmide in elektrokompetente DH5 $\alpha$ :

(Selektion der Transformanten auf cDNA-Bank-Plasmid mit Ampizillin)

- Küvetten 10 mal mit H<sub>2</sub>O dest. waschen und mindestens 5 min auf Eis vorkühlen.
- Kompetente Zellen auftauen und 10  $\mu$ l zu transformierende DNA zugeben.
- Elektroporation bei 2,3 kV (Bio-Rad Gene Pulser), 25  $\mu$ F, Pulse controller auf 200 Ohm.
- Sofort 200 ml SOC-Medium (RT) zugeben und Suspension in Eppendorfgefäß



füllen.

- 1 h bei 37°C schütteln.
- Die Suspension komplett (200 ml) auf SOB-Platten mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit Antibiotikum ausplattieren, Zellsuspension bei RT in die Platten einziehen.
- Platten ü.N. bei 37°C inkubieren.

### **Plasmidisolation aus Bakterienklonen (Minipreps):**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit dem Miniprep-Kit von Qia-gen (Qiaprep 8 Miniprep Kit (50), Kat. Nr. 27144), und von jeder Transformation wurde aus 2 Klonen die Plasmid-DNA isoliert

**Retransformation der isolierten Plasmide in AH109+pGBKT7/gene of interest:** (Selektion der Transformanten auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>), siehe Protokoll Small Scale Transformation

### **positive Transformanden nach Retransformation auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> ausstreichen:**

Platte mit dünnem Edding in 8 gleichgroße Dreiecke unterteilen und jedes Dreieck komplett mit pos. Hefeklon ausstreichen

als Negativkontrolle AH109, transformiert mit pGADT7-T und pGBKT7-Lam und als Positivkontrolle AH109, transformiert mit pGADT7-T+pGBKT7-53 ausstreichen

Die Plasmide, bei denen die Hefen nach dem Ausstreichen auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> gewachsen sind mit dem Primer CE1908 sequenzieren. Schwaches sowie dunkelrot gefärbtes Wachstum als negativ bewerten.

### **benötigte Materialien zur Vorbereitung**

pGBKT7/gene of interest-Transformation:

1 Platte SD Trp<sup>-</sup>

cDNA-Bank-Transformation:

pro Small Scale Ansatz 5 Platten SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> und 1 Platte SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>

Ausstreichen von Interaktionsklonen für Plasmidisolation aus Hefen:

auf 1 Platte SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup> kann man ca. 72 Hefeklone ausstreichen

Herstellung kompetenter DH5α:

1 Platte LB ohne Antibiotikum

2,5 L LB-Medium

1 L H<sub>2</sub>O bidest.

0,5 L 10% Glycerin mit H<sub>2</sub>O bidest. angesetzt

8 sterile PP-Röhrchen

8 sterile 1L Erlenmeyerkolben

1 steriler Messzylinder 250 ml

1 steriler Messzylinder 100 ml

## RNAi-Experimente mit den Yeast-Two-Hybrid Kandidaten

Die mRNA-Fragmente der Interaktionskandidaten *vig-1*, *lec-2* und *lec-4* wurden jeweils mit *Bgl*II aus den Hefevektoren p $\lambda$ ACT ausgeschnitten. Gleichzeitig wurde das Plasmid pCR II-TOPO mit *Bam*HI linearisiert und anschließend die *Bgl*II-Fragmente aus p $\lambda$ ACT in die gespaltene *Bam*HI Restriktionsschnittstelle ligiert.

Zur Klonierung der mRNA-Fragmente von *lec-1*, *lec-3* und *lec-5* wurde mit den isolierten Plasmiden der entsprechenden Interaktionsklone als template-DNA und den Primern CE1908 und CE1726 PCR Reaktionen durchgeführt und die erhaltenen PCR Produkte jeweils in das Plasmid pCR4-TOPO ligiert.

Die mRNA-Fragmente der Kandidaten ZK1128.5, *lec-6*, *lec-7*, *lec-8*, *lec-9* und *lec-10* wurden mit den folgenden Primern aus einer cDNA-Bank von *C. elegans* heraus amplifiziert:

**Tab. A5:** Gene und verwendete Primer für die Amplifizierung von mRNA-Fragmenten.

Gen	Primer	Gen	Primer	Gen	Primer
<i>lec-6</i>	CE1985	<i>lec-9</i>	CE1991	ZK1128.5	CE2036
	CE1986		CE1992		CE2037
<i>lec-7</i>	CE1987	<i>lec-10</i>	CE1993		
	CE1988		CE1994		
<i>lec-8</i>	CE1989	<i>lec-11</i>	CE1995		
	CE1990		CE1996		

## Transformation von Würmern mit der Partikel Kanone

### 1.) Vorbereiten der Würmer zum Schießen

- Pro 1-2 Schüsse eine große Platte mit verhungerten oder gebleichten Würmern animpfen.
- Für jeden Schuss eine kleine Platte in der Mitte mit einem 25  $\mu$ l großen OP50-Tropfen animpfen und ü.N. bei RT oder 4 h bei 37°C inkubieren.
- Sind die Platten mit den Würmern gut bewachsen und tragen sie 3-10 Eier, werden sie mit M9-Puffer von den Platten gespült und in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt und sedimentieren gelassen.
- Während des Absinkens der Würmer die kleinen, mit einem OP50-Tropfen angeimpften Platten auf Eis vorkühlen, damit die später darauf pipettierten Würmer sofort erstarren.
- Die Würmer vom Boden des Pellets mit einer abgeschnittenen Eppendorfspitze abnehmen und mit M9-Puffer 2:1 verdünnen.
- Mit der gleichen Spitze 20  $\mu$ l dieser Verdünnung auf den OP50-Tropfen der vorgekühlten Platten pipettieren und auf Eis inkubieren.
- Ist das Wurmpellet fest, sind die Würmer bereit zum Schießen.
- Nach dem Schießen die kleine Platte in 6 gleichgroße „Kuchenstücke“ teilen, jedes Stück wird auf eine große Platte überführt.

## 2.) Transformation der Würmer mit der Partikel Kanone

- 1 mg Goldpartikel in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß einwiegen.
- 100  $\mu$ l 50 mM Spermidin dazugeben, vortexen und für 10 sec in das Ultraschallbad geben.
- Anschließend 16  $\mu$ g zu transformierende DNA hinzufügen.
- 10 min bei RT inkubieren, dabei das Eppendorfgefäß öfter „anschnippen“, um die Goldpartikel aufzuwirbeln.
- Das DNA-Gold-Gemisch auf 360  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O auffüllen.
- Weitere 10 min bei RT inkubieren dabei das Eppendorfgefäß öfter „anschnippen“, um die Goldpartikel aufzuwirbeln.
- 100  $\mu$ l 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung tropfenweise dazugeben (es darf nicht klumpen) und für 10 min präzipitieren.
- 15 sec bei 13.000 upm abzentrifugieren und den Überstand mit einer Pipette entfernen.
- 3 x mit 1ml 96% Ethanol waschen und in 200  $\mu$ l PVP-Lösung aufnehmen
- pro Schuß 20  $\mu$ l einsetzen.

PVP-Lösung: 100 mg Polyvinylpyrrolidon in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest. lösen  
mit Ethanol [96%] auf 100 ml auffüllen

## Würmer bleichen

- Die Würmer mit ausreichend M9-Puffer von der Platte spülen und in einem geeigneten Reaktionsröhrchen (Eppendorfgefäß oder Falconröhrchen) sammeln.
- Die Würmer durch Zentrifugation 1 min bei RT und 5000 upm pelletieren und den Überstand vorsichtig absaugen.
- 1ml (Eppendorfgefäß) oder 5 ml (Falconröhrchen) frisch angesetzte Hypochloridlösung zu dem Wurmpellet geben und 2 min vortexen (Eppendorfgefäß) oder kräftig schütteln (Falconröhrchen).
- Die Würmer wieder durch Zentrifugation 1 min bei RT und 5000 upm pelletieren, den Überstand absaugen und Pellet mit 1 ml (Eppendorfgefäß) oder 5ml (Falconröhrchen) M9-Puffer waschen.
- Das Wurmpellet nochmal mit Hypochlorid versetzen und vortexen/schütteln, kontrollieren, ob nur noch Embryonen und keine Wurmreste mehr vorhanden sind.
- Wenn nur noch Embryonen zu sehen sind, diese 1 min bei RT und 5000 upm abzentrifugieren und anschließend einmal mit M9-Puffer und dreimal mit H<sub>2</sub>O dest. waschen.
- Zum Schluss die Embryonen in einem geringen Volumen H<sub>2</sub>O dest. aufnehmen und auf den vorbereiteten Teflon-Slides in die entsprechenden Wells pipettieren.
- Einen dicken Wassertropfen auf die Embryonen pipettieren, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

## Proteinexpression in *E. coli*, Proteinextraktion und Aufreinigung

### Proteinexpression

Vorkultur:

- 3 ml LB (100 µg/ml Amp) mit einer frischen, den Expressionsvector tragenden Kolonie animpfen (nicht älter als eine Woche) und über Nacht bei 30°C und 200 upm inkubieren.
- Parallel als Negativkontrolle eine Kolonie des Expressionstammes ohne Expressionsvector mit animpfen.

Hauptkultur:

- Mit 2 ml der Vorkultur 100ml LB (100 µg/ml Amp) animpfen und bei 37°C inkubieren, bis OD<sub>550</sub> = 0,5 erreicht ist.
- 10 µl AHT (2 mg/ml) zum Induzieren der Expression hinzufügen und weitere 3h bei 37°C inkubieren.
- Die Kultur 12min bei 4.500 x g und 4°C abzentrifugieren und den Überstand werfen.

### Proteinextraktion

- Das Zellpellet in 1 ml Lysisbuffer resuspendieren und mit Eiskühlung so lange sonifizieren, bis die Zellyse vollständig ist.
- Das Zellysat 15 min bei 14.000 upm und 4°C abzentrifugieren.
- Den Überstand abnehmen, ein Aliquot aufbewahren (Überstand 1) und den Rest in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.
- Das Pellet in 1 ml Lysisbuffer + 140 mM β-Mercaptoethanol resuspendieren und 30 min im 65°C warmen Wasserbad inkubieren, dabei alle 10min hart vortexen.
- Die Suspension 15 min 13.000 upm abzentrifugieren und den Überstand abnehmen.
- Die Inkubation im 65°C Wasserbad noch zweimal mit jeweils neuem Lysisbuffer + 140 mM β-Mercaptoethanol wiederholen, die Überstände dabei sammeln (Überstand 2) und das restliche Pellet am Schluß in Lysisbuffer + 140 mM β-Mercaptoethanol aufnehmen.
- Von dem Überstand 2 sowie von dem Pellet jeweils ein Aliquot abnehmen und Rest in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.
- Zur Durchführung einer SDS-PAGE müssen die Proteine der Proben ausgefällt werden da GuHCL den korrekten Lauf der Proteine im Gel stört.

## Proteinaufreinigung mit Ni-NTA

- Ni-NTA-Matrix in einem 50 ml Falconröhrchen mit 5 ml Lysispuffer zweimal jeweils 1 h bei RT auf einem Taumelrührer äquilibrieren.
- 4 ml Proteinextrakt mit Lysispuffer 1 : 4 verdünnt, um die  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration von 100 mM auf 25 mM zu reduzieren (=maximale  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration für Ni-NTA-Matrix).
- Verdünntes Proteinextrakt 15 min bei 14.000 upm zentrifugieren und mit der equilibrierten Ni-NTA-Matrix mischen.
- 2 h bei RT auf einem Taumelrührer rühren.
- Die gesamte Suspension in einer leeren Glassäule mit Glasfritte einengen.
- Den Durchfluss der Säule sammeln und auf Eis lagern.
- Die entstandene Ni-NTA-Säule 4 x mit 1 Säulenvolumen Waschpuffer waschen und die Waschfraktionen einzeln sammeln und auf Eis lagern.
- Anschließend 5 x ein halbes Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Säule geben und die Elutionsfraktionen einzeln sammeln und auf Eis lagern.

## Regeneration der Ni-NTA-Matrix

- Säule mit 2 Säulenvolumen Regenerationspuffer waschen.
- Säule mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O waschen.
- Säule mit 3 Säulenvolumen 2% SDS waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 25% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 50% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 75% Ethanol waschen.
- Säule mit 5 Säulenvolumen 100% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 75% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 50% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen 25% Ethanol waschen.
- Säule mit 1 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O waschen.
- Säule mit 5 Säulenvolumen 100 mM EDTA, pH 8.0 waschen.
- Säule mit H<sub>2</sub>O waschen.
- Säule mit 2 Säulenvolumen 100 mM NiSO<sub>4</sub> neu aufladen.
- Säule mit 2 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O waschen.
- Säule mit 2 Säulenvolumen Regenerationspuffer waschen.
- Säule mit 2 Säulenvolumen Lysispuffer äquilibrieren.

## Ausfällen von Proteinen

- 1 Vol 10% TCA zu 1 Vol Proteinlösung hinzufügen, mischen und 20 min auf Eis inkubieren.  
(stark salzhaltige Proteinlösungen vorher mit Wasser verdünnen).
- Präzipitat 15 min bei 14.000 upm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Pellet zweimal in 500  $\mu$ l Ethanol waschen.
- Pellet an der Luft trocknen und in 100  $\mu$ l SDS-Probenpuffer resuspendieren.
- Zur Korrektur des pH-Wertes (gelber Farbumschlag) 10  $\mu$ l Trispuffer (1M, pH 8,0) zugeben (blauer Farbumschlag).

## SDS-PAGE

- Trenn- und Sammelgel in einer vertikalen Polyacrylamidgelkammer vorbereiten und mit SDS-Laufpuffer überschichten.
- Proben 5 min aufkochen.
- Polyacrylamidgel beladen und das Netzgerät bei konst. 100 V laufen lassen.
- Netzgerät ausschalten, wenn die blaue Bande am unteren Ende aus dem Gel heraus läuft.
- Polyacrylamidgel aus der Kammer ausbauen und färben.

a) Coomassie-Blue-Färbung: Gel ü.N. bei RT in Roti-Blue (kolloidale Coomassie Färbelösung) schwenken

b) Silberfärbung:

benötigte Lösungen:

Fixierlösung:	45% Methanol, 5% Essigsäure in Wasser
Thiosulfatlösung:	0,02% Thiosulfat (20 mg in 100ml Wasser)
Silbernitratlösung:	0,1% Silbernitrat (100 mg in 100ml Wasser)
Entwicklerlösung:	0,04% Formaldehyd (37 $\mu$ l 37%ig), 2% Natriumcarbonat (2 g in 100 ml Wasser)
STOP-Lösung:	1% Essigsäure (1 ml in 100 ml Wasser)

- Das Gel 20-30 min in der Fixierlösung baden.
- Fixierlösung abgießen und das Gel 30-60 min (oder ü.N.) in Wasser inkubieren.
- Wasser abgießen und das Gel in der Thiosulfatlösung 1-2 min schwenken.
- Die Thiosulfatlösung entfernen und das Gel zweimal mit kleinen Mengen Wasser ja 1 min waschen.
- Das Gel in kalter Silbernitratlösung 20-40 min im Kühlschrank inkubieren.
- Die Silbernitratlösung abgießen und die Entwicklerlösung auf das Gel geben.
- Das Gel in der Entwicklerlösung schwenken, bis die Proteinbanden in gewünschter Intensität sichtbar sind.
- Durch Abgießen der Entwicklerlösung und Zugabe der STOP-Lösung Entwicklung beenden.
- Das Silber gefärbte Gel in der STOP-Lösung oder in Wasser bei 4°C lagern.

## RNA-Interferenz (1): Herstellung der dsRNA

- Mit genspezifischen Primern einen ca. 1000bp langen Sequenzabschnitt des entsprechenden Gens amplifizieren.
- Die Ausbeute der PCR in einem 1%igen TBE-Agarosegel prüfen.
- Das PCR-Produkt in den Vektor TOPO-TA PCR4 des TOPO-TA Cloning® Kits ligieren (Invitrogen, Kat. Nr. 45-0030).
- Den Ligationsansatz in Hitzeschock kompetente One Shot®-Zellen transformieren (Invitrogen, Kat. Nr. 44-0301).
- Aus positiven Klonen die Plasmid-DNA isolieren (Qiagen Miniprep Kit Kat. Nr. 27144).
- Einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchführen und die entstehenden DNA-Fragmente in einem 1%igen TBE-Agarosegel überprüfen.
- Mit den Primer CE041 und CE042 eine PCR durchführen, um das Insert im TOPO- TA PCR4-Vektor zu amplifizieren.
- PCR-Produkt in einem 1%igen Agarosegel prüfen und mit den Primern CE041 und CE042 ansequenzieren.
- Eine *in-vitro* Transskription durchführen (Ambion MEGAscript® T3 Kat. Nr. 1338, Ambion MEGAscript® T7 Kat. Nr.1334, Promega Ribomax® Large scale RNA Production Sp6 cat.#P1280, Promega Ribomax® Large scale RNA Production T7 cat.#P1300 ).
- Die entstandenen ssRNAs aufreinigen (Qiagen RNeasy Mini Kit Kat. Nr. 74106).
- Je 15 µl der beiden ssRNAs zur Hybridisierung mischen.
- Die Mischung 10 min bei 56°C inkubieren, dann 30 min bei 37°C.
- Die entstandene dsRNA in einem 1,5%igen TAE-Agarosegel prüfen.
- dsRNA bis zum Gebrauch bei –80°C lagern.

## RNA-Interferenz (2): Würmer injizieren

### Injektionsnadeln herstellen

Es werden die Glaskapillaren der Firma World Precision Instruments, Inc. verwendet. Am besten geeignet sind die Kapillaren aus Borsilikat (R-Series, Nr.18150F-4). Die Nadeln werden mit dem Kapillarenzieher der Firma FMI GmbH, Modell BB-CH, so gezogen, dass die Injektionsspitze nicht zu groß ist, um den zu injizierenden Wurm möglichst nicht zu verletzen.

Folgendes Protokoll wurde zum Nadeln Ziehen verwendet:

cooling delay	0	break 1	0
cooling duration	12	break 2	0
cooling position	22	break 3	255
heat 1	750	break 4	0
heat 2	580	break 5	150
heat duration	0	pulling position	15
pause 1	2000	spring position 1	100
pause 2	22000	spring position 2	80



## Agarosepads vorbereiten

- Mit einer Pasteurpipette einen Tropfen 2%ige Agaroselösung auf ein rundes Deckglas (H. Saur, Laborbedarf, Stärke 0,17 mm, Durchmesser 42 mm) geben.
- Schnell ein zweites rundes Deckglas leicht versetzt darauf legen und die Gläser fest zusammendrücken, um eine möglichst dünne Agaroseschicht zu erhalten.
- Kurz warten und dann das obere Deckglas vorsichtig zur Seite abziehen. Die Agaroseschicht sollte möglichst nicht reißen.
- Das untere Deckglas mit der Agaroseschicht nach oben auf einen heißen Heizblock legen und über Nacht zum Trocknen liegen lassen.
- inverses Mikroskop, dsRNA-Lösung und Luftdruck vorbereiten

Es wird ein inverses Mikroskop verwendet (Zeiss, Axiovert10), welches mit einem Mikromanipulator ausgestattet ist. Der Mikromanipulator ist mit einem Luftdruck-Regulator (Pneumatic Picopump, PV830) verbunden, über den der Injektionsdruck reguliert werden kann.

- Die dsRNA-Lösung vor Gebrauch 5 min bei  $V_{\max}$  zentrifugieren, um ein Verstopfen der Injektionsnadel zu vermeiden.
- Die Injektionsnadel mit ca. 3  $\mu$ l dsRNA-Lösung beladen und in dem Mikromanipulator einsetzen.
- Die Luftzufuhr für den Luftdruckregler öffnen und so einstellen, dass die dsRNA-Lösung langsam in die Spitze der Injektionsnadel gedrückt wird (mikroskopische Kontrolle).
- Wenn die dsRNA-Lösung beginnt, aus der Nadel auszutreten, Luftdruck reduzieren, sodass die dsRNA-Lösung gerade in der Nadelspitze bleibt.

## Würmer injizieren

Es werden junge adulte Würmer injiziert, die bereits ca. 3-5 Eier tragen.

- Einen kleinen Tropfen Halocarbon-Öl 700 (Sigma) auf ein frisch hergestelltes und über Nacht getrocknetes Agarosepad geben.
- Unter den binokularen Mikroskop einen Wurm mit dem Platinspatel von der Kulturplatte nehmen und in dem Öltropfen durch Hin- und Herbewegen des Spatels vom Spatel lösen.
- Das Absinken des Wurmes im Öl mit einer an einem Zahnstocher festgeklebten Wimper durch Hin- und Herstreichen über den Wurm beschleunigen.
- Warten, bis sich der Wurm abgesetzt hat und fest an dem Agarosepad haftet.
- Erst wenn sich der Wurm über seine ganze Länge nicht mehr bewegen kann: das Deckglas in die vorgesehene Halterung des inversen Mikroskops legen und auf dem Objektivtisch des Mikroskops montieren.
- Mit der 5x-Vergrößerung den Wurm suchen und in die Mitte des Sichtfeldes schieben, dabei das Agarosepad mit dem Wurm drauf so drehen, dass er im 90° Winkel zu der Injektionsnadel liegt.
- Die Injektionsnadel möglichst nah am Wurm justieren und auf die 40x-Vergrößerung wechseln.

- Den Wurm so fokussieren, dass sein äußerster Rand am schärfsten zu sehen ist.
- Die Injektionsnadel langsam nach unten steuern, bis sie scharf ins Blickfeld kommt.
- Die Nadel in der Höhe so verstellen, dass sie an der äußersten Spitze scharf ist.
- Vorsichtig die Nadel an den Wurm neben eine seiner Gonaden heranhfahren, und dann den Wurm langsam gegen die Nadelspitze schieben, bis die Nadelspitze die Hypodermis des Wurmes eindrückt.
- Mit den Fingern leicht gegen den Mikromanipulator tippen, sodass die Nadelspitze die Hypodermis durchsticht und in die Gonade des Wurmes hineinragt.
- Den Luftdruck manuell langsam erhöhen, bis gut sichtbar dsRNA-Lösung in die Gonade strömt, dann den Luftdruck sofort wieder herunter regulieren.
- Den Wurm von der Nadel wegziehen.
- Es werden immer beide Gonaden eines Wurmes injiziert.

#### Recover und Analyse der injizierten Tiere

- Wenn in beide Gonaden injiziert wurde, unter dem binokularen Mikroskop einen Tropfen M9-Puffer an der Stelle auf das Halocarbon-Öl geben, an der der Wurm fixiert ist, und absinken lassen.
- Sobald der Tropfen das Agarosepad erreicht, löst sich der Wurm von seiner Fixierung.
- Den Wurm mit den Platinspatel oder mit der Wimper aus dem Tropfen auf eine kleinen Platte vereinzeln und bei 20°C inkubieren.
- Alle 8-12 Stunden den Wurm auf eine neue kleine Platte vereinzeln und auf der vorherigen kleinen Platte kontrollieren, ob der injizierte Wurm Eier gelegt, und ob die Eier geschlüpft sind oder nicht.
- Sobald tote Eier auf einer Platte erscheinen, den injizierten Wurm aufschneiden und die Embryonen für die 4D-Mikroskopie präparieren.

## TAP-tag-Aufreinigung

### Proteinextraktion

- Zur Gewinnung von *C. elegans* Embryonen zur TAP-tag Aufreinigung werden die Würmer in Flüssigkultur in großen Mengen gezüchtet und nach dem Ernten der Flüssigkultur geblichen.
- Die Embryonen werden in einem kleinen Volumen PBS + PMSF + 10%Triton aufgenommen und entweder zur Lagerung in fl. Stickstoff schockgefroren oder gleich weiterverarbeitet.
- Die Embryonen im PBS + PMSF + 10%Triton werden mit NP-40 Puffer (mit Inhibitoren) auf 50 ml oder 100 ml aufgefüllt.
- Der Embryonen- und Zellaufschluss erfolgt mit Glasperlen in einem Bead-Beater je nach Menge der Embryonen mit großem (100 ml) oder kleinem (50 ml) Aufsatz.

- Den Bead-Beater so lange abwechselnd 30 sec lang einschalten und zur Kühlung 30 sec lang ausschalten, bis alle Embryonen zerstört sind (ca. 12-15x, mikroskopische Kontrolle).
- Das Protein-Rohextrakt in ein großes 50 ml-Falcon überführen.
- Zur besseren Lösung von Membran gebundenen Proteinen das Protein-Rohextrakt noch 30 min lang auf Eis inkubieren.

### **Aufreinigung mit IgG-Sepharose-Beads**

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll zur TAP-tag Aufreinigung von Hefeproteinen (Gould et. al.,2004), dieses wurde jedoch an einigen Stellen verändert. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Es werden von allen Überständen, Waschfraktionen und Eluatn kleine Aliquots für eine SDS-PAGE abgenommen und sogleich mit SDS-Probenpuffer gemischt, um ihre weitere Zersetzung zu vermeiden.

- Vor der Zugabe der IgG-Sepharose Beads das Protein-Rohextrakt so lange zentrifugieren, bis der Überstand möglichst klar ist, den Überstand anschließend in eine neues 50 ml Falcon überführen.
- Die IgG Sepharose Beads zum äquilibrieren 3 x mit 1 ml NP-40 Puffer (ohne Inhibitoren) waschen (je 1 min bei 2000 upm pelletieren).
- In 50 ml Überstand 500 ml äquilibrierte IgG Sepharosebeads hinzufügen und mindestens 4 h oder ü.N. bei 4°C inkubieren.
- Die IgG-Sepharose abzentrifugieren (3 min, 2000 upm, 4°C).
- Das IgG-Sepharose-Pellet mit einer langen Pasteurpipette vom Boden des Falconröhrchens abnehmen und in ein 2 ml Eppendorf überführen.
- Zu dem Überstand nochmals 500 ml äquilibrierte IgG-Sepharose hinzufügen und weitere 4 h oder ü.N. bei 4°C inkubieren.
- (Während dessen mit der IgG Sepharose von der ersten Inkubation im Protokoll fortfahren und nach der zweiten Inkubation mit den zweiten Beads genau so weiterarbeiten. Es kann noch ein drittes Mal mit Beads inkubiert werden, um möglichst alle TAP-getagten Proteine aus dem Überstand aufzureinigen).
- Die IgG Beads vier mal mit 1 ml IPP150-Puffer waschen (jeweils 1 min bei 2000 upm zentrifugieren).
- Die IgG Beads zwei mal mit 1 ml TEV Cleavage Buffer waschen (jeweils 1min 2000 upm).

### **Proteasebehandlung der IgG-Sepharose gekoppelten Proteine**

- Die IgG-Beads zwei mal mit 1 ml TEV Cleavage Buffer waschen (jeweils 1min 2000 upm).
- 500  $\mu$ l TEV Cleavage Buffer und 10  $\mu$ l TEV Protease zu den IgG Beads hinzufügen vor dem Schließen des Eppendorfgefäßes die Öffnung mit Parafilm verschließen, um den Verlust von IgG-Beads zu verhindern.
- 2 h bei 16°C oder ü.N. inkubieren.

### **Aufreinigung mit Calmodulin-Beads**

- Die Calmodulin Beads zum äquilibrieren 3 x mit 1 ml Calmodulin Binding Buffer waschen (je 1 min bei 2000 upm zentrifugieren).
- Die IgG-Beads abzentrifugieren (jeweils 2 min 2000 upm) und den Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß aufnehmen.
- Die Beads 3x mit 500 ml Calmodulin Binding Buffer waschen (jeweils 1min 2000 upm), und die Überstände mit dem vorherigen Überstand mischen.
- Zu dem gesammelten Überstand 1M  $\text{CaCl}_2$  hinzufügen (4  $\mu$ l/ml).
- Die Calmodulin Beads zum äquilibrieren 3x mit 1 ml Calmodulin Binding Buffer waschen (je 1 min bei 2000 upm zentrifugieren).
- Den Überstand in ein neues Gefäß pipettieren, welches 300  $\mu$ l äquilibrierte Calmodulin-Beads enthält (dabei darauf achten, das nicht das Pellet am Boden des Gefäßes mit pipettiert wird, da dieses Reste von IgG-Beads enthält).
- Vor dem Schließen des Eppendorfgefäßes die Öffnung mit Parafilm verschliessen, um den Verlust von Calmodulin Beats zu verhindern.
- 4 h oder ü.N. bei 4°C inkubieren.
- Die Calmodulin Beads abzentrifugieren (2 min 2000 upm).
- Den Überstand abnehmen und in einem neuen Eppendorfgefäß sammeln.
- Die Calmodulin Beads 6x mit Calmodulin Beads waschen.
- 1 ml SDS-Probenpuffer auf die Calmodulin Beads geben.
- Alle zwischen durch abgenommenen Proben in einem SDS-Polyacrylamid-Gel auftragen oder einfrieren.

### **Copräzipitation mit magnetischen ProteinG-Beads**

Die Würmer werden wie in dem TAP-tag Protokoll beschrieben aufgeschlossen und das Gesamtproteinextrakt abzentrifugiert.

Es wurden Dynabeads® ProteinG der Firma invitrogen verwendet.

- Die Beads zu 20 – 50 ml Überstand des Proteinextraktes in einem 50 ml Falcon-Röhrchen geben.
- 5 h oder ü.N. bei 4°C auf einem vertikalen Rad inkubieren.
- Das Proteinextrakt mit den Beads auf 2 ml Eppendorf-Gefäße aufteilen.

- Die Beads mit einem geeigneten Magneten an den Rand der Eppendorf-Gefäße ziehen und mit einer Pipette die Überstände aus den Eppendorf-Gefäßen abnehmen.
- Die Beads 3 x mit je 1 ml IPP150-Puffer waschen und nach jeden Waschschrift mit dem Magneten aus dem Puffer separieren.
- Eine geringe Menge (100 – 200  $\mu$ l) SDS-Ladepuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol zu den Beads geben, hart vortexen und die Beads wieder separieren.
- Den SDS-Ladepuffer in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettieren und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versehen.

### benötigte Puffer und Stocklösungen:

#### Stock Lösungen:

Alle Stocklösungen bei 4°C lagern.

10% NP-40	5 M NaCl	0,5 M EDTA
1 M DTT	1 M Tris-HCl pH 8,0	1 M MgAcetat
1 M Imidazol	1 M $\text{CaCl}_2$	14,3 M $\beta$ -Mercaptoethanol (BME)

#### Puffer:

Alle Puffer vor Gebrauch auf Eis kühlen.

<u>NP40 Puffer (1L):</u>			
6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,853 g		
4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,553 g		
1 % NONIDET P-40	10 ml	100% Stocklösung	
150 mM NaCl	8,767 g		
2 mM EDTA	4 ml	0,5M Stocklösung	
50 mM NaF	2,1 g		
4 $\mu$ g/ml Leupeptin	4 mg		
0,1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$	0,01839 g		

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen

die folgenden Inhibitoren vor Gebrauch pro 50ml NP-40 Puffer hinzufügen:

- 1 Tablette, EDTA frei (Boehringer Mannheim Kat. Nr. 1873580)
- 130  $\mu$ l 0,5M Benzamidin in 100% Ethanol (0,0392 mg in 0,5 ml)
- 500  $\mu$ l 0,1M PMSF in 100% Ethanol (0,026 mg in 1,5 ml)

IPP150 (250 ml):

10 mM Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml 1 M Stocklösung
150 mM NaCl	7,5 ml 5 M Stocklösung
0,1% NP-40	2,5 ml 10% Stocklösung

mit dH<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen

**TEV Cleavage Buffer (TEV CB) (250 ml):**

10 mM Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml	1 M Stocklösung
150 mM NaCl	7,5 ml	5 M Stocklösung
0,1% NP-40	2,5 ml	10 % Stocklösung
0,5 mM EDTA	250 $\mu$ l	0,5 M Stocklösung
1 mM DTT	250 $\mu$ l	1 M Stocklösung

mit dH<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen

DTT sollte erst direkt vor dem Gebrauch hinzugefügt werden

**IPP150 Calmodulin Binding Buffer (CBB) (250 ml):**

10 mM Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml	1 M Stocklösung
150 mM NaCl	7,5 ml	5 M Stocklösung
1 mM Mg <sup>2+</sup> Acetat	250 $\mu$ l	1 M Stocklösung
1 mM Imidazol	250 $\mu$ l	1 M Stocklösung
2 mM CaCl <sub>2</sub>	500 $\mu$ l	1 M Stocklösung
0,1% NP-40	2,5 ml	10 % Stocklösung
10 mM BME	174 $\mu$ l	14,3 M Stocklösung

mit dH<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen

BME sollte erst direkt vor dem Gebrauch hinzugefügt werden

**SDS Probenpuffer (2x) pH 6,8 (100ml):**

100 mM Tris- HCl	12,1 g/ml
4% SDS	4 g
0,2% Bromphenol Blau	0,2 g
20% Glycerin	20 ml
200 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	*

Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol bei RT lagern

$\beta$ -Mercaptoethanol [14 M] vor Gebrauch frisch hinzufügen (15  $\mu$ l/ml)

**Western-Blot nach Bio-Rad® „Amplified Opti-4CN Substrate Kit“:****Aufbau des Westernblots:**

Kathode

3 Schichten Whatmanpapier in Kathodenpuffer

SDS-Gel

Nitrocellulosemembran in Anodenpuffer I

3 Schichten Whatmanpapier in Anodenpuffer I

3 Schichten Whatmanpapier in Anodenpuffer II

Anode

**Durchführung des Blot:** (Amplification Kit (#170-8238))

- Den Western-Blot wie oben beschrieben zusammenbauen.
- 1 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> blotten.
- Den Blot auseinander bauen und die geblottete Membran zum Färben 2-3 min in Ponceau S Färbelösung schwenken.
- Markerbanden mit Bleistift auf der Membran nachzeichnen und Membran mit Leitungswasser so gut wie möglich entfärben.
- Membran trocknen.
- Membran in PBST anfeuchten.
- 5 min in PBST waschen.
- Mit 3% Blocker (RT!) von Bio-Rad® 1h RT oder 4°C ü.N. blocken.
- 2x 5 min mit PBS waschen.
- Mit primärem Antikörper (1:1000 in PBST mit 1% BSA v/v) 1h RT oder 4°C ü.N. inkubieren.
- 2x 5 min mit PBS waschen.
- Mit sekundärem Antikörper (1:1500 in PBST mit 1% BSA v/v) 1h RT oder 4°C ü.N. inkubieren.
- 2x 5 min mit PBS waschen.

**Signalverstärkung:**

- 85 µl 1x BAR/cm<sup>2</sup> Membran ansetzen.
- PBS abgießen und Membran 10 min in 1x BAR inkubieren.
- 3x 5 min mit 20% DMSO/PBST waschen.
- 2x 5 min mit PBS waschen.
- Membran 30 min in 85 µl Streptavidin-HRP/cm<sup>2</sup> (1:1000 in PBST mit 1% BSA v/v) inkubieren.
- 2x 5 min mit PBS waschen.

**Colorimetrische Detektion:**

- 0,25 ml <Opti-4CN diluent solution> / cm<sup>2</sup> Membran ansetzen.
- Substratlösung ansetzen: 0,2 ml Opti-4CN Substrat pro 10 ml „diluent solution“ hinzufügen und mischen (Lösung wird trüb).
- Membrane in Substratlösung schwenken, bis die gewünschte Signalstärke erreicht ist.
- Membrane 15 min in ddH<sub>2</sub>O waschen, trocknen, lagern oder dokumentieren.

**20% DMSO/PBST:**

100 ml DMSO  
400 ml 1xPBST

**Antikörper-Verdünnung:**

0,75 g BAS immer frisch  
75 ml PBST ansetzen!

**1xBAR**

2 Vol 2x amplif.diluent  
1 Vol 4x BAR



## Western-Blot mit Chemolumineszenz-Detektion:

Aufbau des Westernblots:

Kathode

3 Schichten Whatmanpapier in Kathodenpuffer

SDS-Gel

Nitrocellulosemembran in Anodenpuffer I

3 Schichten Whatmanpapier in Anodenpuffer I

3 Schichten Whatmanpapier in Anodenpuffer II

Anode

### Durchführung des Blots:

- Den Western-Blot wie oben beschrieben zusammenbauen.
- 1 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> blotten.
- Den Blot auseinander bauen und die geblottete Membran zum Färben 2-3 min in Ponceau-S-Färbelösung schwenken.
- Markerbanden und den Start des Gels mit Bleistift auf der Membran nachzeichnen und Membran mit Leitungswasser so gut wie möglich entfärben.
- Membran 1 h in Blockmilch (10% Magermilchpulver in TBS) blocken.
- 2x 5 min mit TBS waschen.
- Membran in primärem Antikörper (1:1000 in TBS) 1h RT oder ü.N. 4°C inkubieren.
- 2x 5 min mit TBS waschen.
- Membran in sekundärem Antikörper (1:1500 in TBS) 1h RT oder ü.N. 4°C inkubieren.
- 1x 5 min mit TBS waschen.
- 2x 20 min mit TBS + 0,05% Tween20 waschen.
- 1x 5 min mit TBS waschen.

### Chemolumineszenz-Detektion:

- Die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in die Blot-Kassette legen.
- In der Dunkelkammer: ECL-Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen mischen und auf die Membran pipettieren und wenige 1-2 Minuten inkubieren.
- ECL-Lösung mit Küchenpapier abtupfen.
- Membran mit Klarsichtfolie abdecken und Film zum Belichten auflegen.
- Blot-Kassette schliessen und 30 sec - 1 min warten.
- Blot-Kassette öffnen, Film herausnehmen und zweiten Film auflegen.
- Während der zweite Film belichtet 5-15 min, den ersten Film in Entwicklerlösung eintauchen, bis Banden sichtbar werden.
- Film in Fixierer-Lösung eintauchen, bis er durchsichtig wird, dann kurz in Wasser waschen und an der Luft oder mit Druckluft trocknen.
- Den zweiten Film wie den ersten entwickeln.

**benötigte Puffer:**

TBS (1L) pH 8,0:	7,94 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	3 g	Tris-HCl

**YAC – Rekombination**

Bei dieser Technik wird die Fähigkeit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* genutzt, lineare DNA-Fragmente effizient über homologe Rekombination in genomische DNA zu integrieren. So können bestimmte Sequenzen (zum Beispiel die von *gfp*) gezielt mit gewünschten Sequenzabschnitten im Genom von *C. elegans*, teilweise als YAC in der Hefe vorliegend, fusioniert werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der klassischen Klonierung in Expressionsvektoren ist, dass eine anschließende Transformation von *C. elegans* mit einem komplexeren genomischen DNA-Gemisch (der aufgereinigten genomischen DNA aus der Hefe) meist effektiver und nicht letal ist im Vergleich zur Transformation mit reinen und aufkonzentrierten Expressionsvektoren. Zuerst wird eine PCR durchgeführt, bei der die zu integrierende Sequenz mit zwei langen Primern amplifiziert wird, welche mindestens 50 bp Homologie zu der Stelle zeigen, an der das PCR-Produkt im Genom integriert werden soll. Das erhaltene PCR-Produkt wird in ein Plasmid subkloniert und dieses dann in Bakterien transformiert. Nach einer Kultivierung der Bakterien in einem entsprechenden Selektionsmedium wird das Plasmid isoliert, aufgereinigt und sequenziert. Ist die Sequenz des PCR-Produktes fehlerfrei, so wird das Plasmid in größerer in Bakterienkultur hergestellt und höherer Konzentration aufgereinigt. Mit einem oder zwei geeigneten Restriktionsendonucleasen wird das Plasmid anschließend gespalten und als lineare Plasmid-DNA in Hefen transformiert, welche das YAC beinhalten, auf dem die genomische Zielsequenz (die mit dem PCR-Produkt zu fusionierende Sequenz) kodiert ist. Als Selektionsmarker für diese Hefetransformation wird ein für die Kanamycinresistenz kodierendes Gen unter der Kontrolle eines hefespezifischen Promoters verwendet, und die Selektion der Transformanten erfolgt mit dem Kanamycin-Derivat Geneticin G418. Nur Hefeklone, die bei der Transformation das PCR-Produkt mit dem Kanamycin-Resistenzgen aufgenommen haben, können wachsen. Aus diesen Klonen wird die genomische DNA isoliert und mittels PCR die Integration des PCR Produktes an der korrekten Stelle innerhalb der genomischen YAC-DNA überprüft.

**Isolierung genomischer DNA aus Hefen**

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefen erfolgte mit dem Genomic DNA Buffer Set, Kat. Nr. 19060 der Firma Qiagen.

## Referenzen

- Ahnn, J., Fire, A.** (1994). A screen for genetic loci required for body-wall development during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. Jun;137(2):483-98.
- Arata, Y., Hirabayashi, J., Kasia, K.** (1997). Structure of the 32-kDa galectin gene of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. Oct 17;272(42):26669-26677.
- Arata, Y., Hirabayashi, J., Kasia, K.** (2001). Sugar binding properties of the two lectin domains of the tandem repeat-type galectin *LEC-1* (N32) of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. Feb 2;276(5):3068-3077.
- Barstead, R.J. and Waterston, R.H.** (1991). Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J. Cell Biol.* 114, 715-724.
- Barstead, R.J., Kleiman, L. and Waterston, R. H.** (1991). Cloning, sequencing, and mapping of an  $\alpha$ -actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20, 69-78.
- Baugh, L.R., Hill, A.A., Claggett, J.M., Hill-Harfe, K., Wen, J.C., Slonim, D.K., Brown, E.L., Hunter C.P.** (2005). The homeodomain protein PAL-1 specifies a lineage-specific regulatory network in the *C. elegans* embryo. *Development*. Apr;132(8):1843-54.
- Belloch, R., Newman, C., Kimble, J** (1999). Control of cell migration during *Caenorhabditis elegans* development. *Curr Opin Cell Biol.* 11:608-613.
- Biron, V.A., Iglesias, M.M., Troncoso, M.F., Besio-Moreno, M., Patrignani, Z.J., Pignataro, O.P., Wolfenstein-Todel, C.** (2006). Galectin-1: biphasic regulation of Leydig tumor cells. *Glycobiology*. 16(9):810-21.
- Bischoff, M., Schnabel, R.** (2006). A posterior centre establishes and maintains polarity of the *Caenorhabditis elegans* embryo by a Wnt-dependent Relay Mechanism. *Plos Biology*, Dezember;4(12), im Druck.
- Bischoff, M., Schnabel, R.** (2006). Global cell sorting is mediated by local cell-cell interactions in the *C. elegans* embryo. *Dev Biol*. Jun 15;294(2):432-44.
- Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chui, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller, S.C.** (1985). Plasticity of the differential state. *Science* 230:758-766.
- Blaser, C., Kaufmann, M., Muller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L., Pircher, H.** (1998).  $\beta$ -galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur Immunol*. 28:2311-9.
- Bloom, J., Peschiaroli, A., Demartino, G., Pagano, M.** (2006). Modification of Cul1 regulates its association with proteasomal subunits. *Cell Div.* Apr 28;1-5.
- Bornhovd, C., Vogel, F., Neupert, W., Reichert, A.S.** (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem*. May 19;281(20):13990-8.
- Bowerman, B., Ingram, M.K., Hunter, C.P.** (1997). The maternal *par* genes and the segregation of cell fate specification activities in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*. Oct;124(19):3815-26.
- Bowerman, B., Kurz, T.** (2006). Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis. *Development*. Mar;133(5):773-84.
- Britton, C., Murray, L.** (2004). Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell.Sci.* Oct 1;117(Pt21):5133-43.
- Buckingham, S.D., Esmaeili, B., Wood, M., Sattelle, D.B.** (2004). RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum Mol Genet*. Okt 1;13 Spec No 2:R275-88.
- Burdine, R.D., Branda, C.S., Stern, M.J.** (1998). EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development* 125:1083-1093.
- Campbell, K. P.** (1995). Three muscular dystrophies: loss of zytoskeleton extracellular matrix linkage. *Cell* 80, 675-679.

- Chang, N.C.A., Hung, S.I., Hwa, K.Y., Kato, I., Chen, J., Liu, C.H., Chang, A.C.** (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J. Biol. Chem.* May18;276(20):17497-17506.
- Charls, E.W., Krizus, A., Dennis, J.W.** (2001). Complementary expression patterns of six nonessential *Caenorhabditis elegans* core 2/I N-acetylglucosaminyltransferase homologues. *Glycobiology*. 11(11):979-988.
- Chen, W., Chen, S., Yap, S. F. and Lim, L.** (1996). The *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase (CePAK) colocalizes with CeRac1 and CDC42Ce at hypodermal cell boundaries during embryo elongation. *J. Biol. Chem.* 271, 26362-26368.
- Chen, S., Zhou, S., Sarker, M., Spence, A.M., Schachter, H.**(1999). Expression of three *Caenorhabditis elegans* N-Acetylglucosaminyltransferase I genes during development. *J Biol. Chem.* Jan 1;274(1):288-297.
- Chen, H.H., Wang, Y.C., Fann, M.J.** (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol.* Apr;26(7):2736-45.
- Cho, M., Cummings, R.C.,** (1996). Characterisation of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 35:13081-8.
- Cipollo, J.F., Awad, A.M., Costello, C.E., Hirschberg, C.B.** (2005). N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol. Chem.* Jul15;280(28):26063-26072.
- Cooper, D.N.W., Barondes, S.H.** (1990). Evidence for export of a muscle lectin from zytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110, 1681-91.
- Cowan, A.E., McIntosh, J.R.** (1985). Mapping the distribution of differentiation potential for intestine, muscle, and hypodermis during early development in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 41(3):923-32
- Cox, E.A., Hardin, J.** (2004) Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. *J Cell Sci.* 117, 1885-1897.
- Drabikowski, K., Trzebiatowska, A., Chiquet-Ehrismann, R.** (2005). *ten-1*, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* Jun 1;282(1):27-38.
- DiNardo, S., Heemskerk, J., Dougan, S., O'Farrell, P.H.** (1994). The making of a maggot: patterning the *Drosophila* embryonic epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* Aug;4(4):529-34.
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell* Mar 28;44(6):817-29.
- Essentials of Glycobiology**, Cold Spring Harbor Press 1999.
- Falcone, F.H., Loke, P., Zang, X., MacDonald, A.S., Maizels, R.M., Allen, J.E.** (2001). A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. *J Immunol.* Nov.1;167(9):5348-54.
- Freeze, H.H.** (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.* Jul;7(7)537-51.
- Fukata M., Nakagawa M., Kaibuchi K.** (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol.* Okt; 15(5):590-7.
- Fukaya, K., Hasegawa, M., Mashitani, T., Kadoya, T., Horie, H., Hayashi Y., Fujisawa, H., Tachibana, O., Kida, S., Yamashita, J.** (2003). Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transfected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* Feb;62(2):162-72.
- Fukuda, M.** (1995). Carbohydrate-dependent cell adhesion. *Bioorg Med Chem.* Mar;3(3):207-15.
- Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Siebert, H.C.** (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* Sep 19;1572(2-3):165-77.
- Gabius, H.J., Siebert, H.C., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Rudiger, H.** (2004) Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem.* Jun7;5(6):740-64.

- Gerdt, S., Dennis, R.D., Borgonie, G., Schnabel, R., Geyer, R.** (1999). Isolation, characterisation and immunolocalization of phosphorylcholin-substituted glycolipids in developmental stages of *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* 266:952-963.
- Gillian, A.L., Svaren, J.** (2004) The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* Mar 5;279(10):9056-63.
- Granato, M., Schnabel, H., Schnabel, R.** (1994). Genesis of an organ: molecular analysis of the *pha-1* gene. *Development*. Oct;120(10):3005-17.
- Grill, S.W., Gonczy, P., Stelzer, E.H., Hyman, A.A.** (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. Feb 1;409(6820):630-3.
- Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M.C. and Segalat, L.** (2002). Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 294, 77-86.
- Gruneberg, U., Glotzer, M., Gartner, A., Nigg, E.A.** (2002). The CeCDC-14 phosphatase is required for cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Sep 2;158(5):901-14*.
- Haltiwanger, R.S., Lowe, J.B.** (2004). Role of Glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 491-537.
- Hannon, G.J.** (2002). RNA interference. *Nature*. Jul 11;418:244-51.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Hall, D.H.** (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, 2:61-85.
- Helenius, A., Aebi, M.** (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmatic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73:1019-49.
- Hernandez, J.D., Baum, L.G.** (2002). Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*. 12(10):127R-136R.
- Hickson, G.R.X., Echard, A., O'Farrell, P.H.** (2006). Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis. *Current Biology* 16, 359–370.
- Hintze, A.** (2006). Charakterisierung der Musterbildung durch Zellwanderungen in *Caenorhabditis elegans*. Dissertation, Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie, Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig.
- Hirabajashi, J., Satoh, M., Kasai, K.** (1992). Evidence that *Caenorhabditis elegans* 32-kDa  $\beta$ -galactoside-binding protein is homologous to vertebrate  $\beta$ -galactoside-binding lectins. *J Biol Chem*. August 5;267(22):15485-15490.
- Hoepfner, D.J., Hengartner, M.O., Schnabel, R.** (2001). Engulfment genes cooperate with *ced-3* to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* Jul 12;412(6843):202-6.
- Hollingworth, D, Noble, C.G., Taylor, I.A., Ramos, A.** (2006). RNA polymerase II CTD phosphopeptides compete with RNA for the interaction with Pcf11. *RNA* Apr;12(4):555-60.
- Holway, A.H., Kim, S.H., La Volpe, A., Michael, W.M.** (2006). Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol.* Mar 27;172(7):999-1008.
- Horie, H., Kadoya, T.** (2004). Galectin-1 plays essential roles in adult mammalian nervous tissues. Roles of oxidized galectin -1. *Glycocon J.* 19(7-9):479-89.
- Houle, J., Balthazar, J., West, C.M.** (1989) A glycosylation mutation affects cell fate in chimeras of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* May; 86:3679-3683.
- Hsu, D.K., Liu, F.T.** (2004). Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycocon. J.* 19:507-515.
- Huang, C.C., Hall, D.H., Hedgecock, E.M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B.E., Hutter, H., Chisholm, A.D., Yurchenco, P.D. and Wadsworth, W.G.** (2003). Laminin  $\alpha$ -subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130, 3343-3358.
- Hutter, H., Schnabel, R.** (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development*. Jul;120(7):2051-64.

- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H., Matsumoto, K.** (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. Jun 24;399(6738):798-802.
- Ishmael, S.S., Ishmael, F.I., Jones, A.D., Bond, J.S.** (2006). Protease domain glycans affect oligomerization, disulfide bond formation, and stability of the meprin A metalloprotease homooligomer. *J Biol Chem*. Oct. 13.
- Jacob, T.C., Kaplan, J.M.,** (2003). The EGL-21 carboxypeptidase E facilitates acetylcholine release at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions.
- Jantsch-Plunger, V., Gönczy, P., Romano, A., Schnabel, H., Hamill, D., Schnabel, R., Hyman, A.A., Glotzer, M.** (2000). CYK-4: A Rho family GTPase Activating Protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol*. Jun26;149(7):1391-1404.
- Jenna, S., Caruso, M.E., Emadali, A., Nguyen, D.T., Dominguez, M., Li, S., Roy, R., Reboul, J., Vidal, M., Tzimas, G.N., Bosse, R., Chevet, E.** (2005). Regulation of membrane trafficking by a novel Cdc42-related protein in *Caenorhabditis elegans* epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. Apr;16(4):1629-39.
- Kaletta, T., Schnabel, H., Schnabel, R.** (1997). Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. Nov 20;390(6657):294-8.
- Kaltner, H., Stierstorfer B.** (1998). Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat (Basel)*;161(1-4):162-79.
- Kamath, R.S., Ahringer, J.** (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*. Aug;30(4):313-21.
- Kioi, M., Seetharam, S., Puri, R.K.** (2006). N-linked glycosylation of IL-13R{alpha}2 is essential for optimal IL-13 inhibitory activity. *FASEB J*. Oct. 3
- Kuwabara, I., Liu, F.T.,** (1996). Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol*. May 15;156(10):3939-44.
- Lawrence, P.A., Sampedro, J.,** (1993). *Drosophila* segmentation: after the first three hours. *Development*. Dec;119(4):971-6.
- Lawrence, P.A., Morata, G.** (1994). Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell*. Jul 29;78(2):181-9.
- Layden, M., Schwartz, A., Mookerjee, S., Hagen, F.** (2001). *gly-2* through *gly-11* are glycosyltransferases critical for embryo morphogenesis. *International C.elegans meeting*. Abstract 1049.
- Lee, J.Y., Goldstein, B.** (2003). Mechanisms of cell positioning during *C. elegans* gastrulation. *Development* 130;307-320.
- Leppanen, A., Stowell, S., Blixt, O., Cummings, R.D.** (2005). Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetylactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem*. Feb 18;280(7):5549-62.
- Li, M.G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L.G., Field, C.M., Hays, T.S.** (1999). Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell. Biol*. Sep 6;146(5):1061-74.
- Lipsick, J.S., Beyer, E.C., Barondes, S.H., Kaplan, N.O.,** (1980.) Lectins from chicken tissues are mitogenic for thy-1 negative murine spleen cells. *Biochem Biophys Res Comm* 97:56-61.
- Luby-Phelps, K.** (1993). Effect of cytoarchitecture on the transport and localization of protein synthetic machinery. *J Cell Biochem*. Jun;52(2):140-7.
- Ma, F., Forbes, J.G., Gutierrez.Cruz, G., Wang, K.** (2006). Titin as a giant scaffold for integrating stress and SH3-mediated signaling pathways: The clustering of novel overlap ligand motifs in the elastic PEVK segment. *J Biol Chem*. Jun 8.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., Sugimoto, A.** (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol*. Feb 6;11:171-176.

- Mulivor, A.W., Lipowsky, H.H.** (2002). Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Oct;283(4):H1282-91.
- Nair, M.G., Cochrane, D.W., Allen, J.E.** (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of *Ym1* and *Fizz1* that can be partly replicated *In-vitro*. *Immunol. Letters.* 85:173-180.
- Nance, J.** (2005) PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays* Feb;27(2):126-35.
- Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y., Wada, Y.** (1997). Vam2/Vps41p and Vam6/Vps39p are components of a protein complex on the vacuolar membranes and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* Apr 25;272(17):11344-9.
- Nilsson, C.L.** (2003). Lectins: proteins that interpret the sugar code. *Anal Chem.* Aug 1;75(15):348A-353A.
- Ohtsubo, L., Marth, J.D.** (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* Sep 8;126(5):855-67.
- Oka, N., Nakahara, S., Takenaka, Y., Fukumori, T., Hogan, V., Kanayama, H.O., Yanagawa, T., Raz, A.** (2005). Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* Sep 1;65(17):7546-53.
- Okkema, P.G., Ha, E., Haun, C., Chen, W., Fire, A.** (1997). The *Caenorhabditis elegans* NK-2 homeobox gene *ceh-22* activates pharyngeal muscle gene expression in combination with *pha-1* and is required for normal pharyngeal development. *Development.* Oct;124(20):3965-73.
- Pace, K.E., Baum, G.** (2004) Insect galectins: roles in immunity and development. *Glycocon J.* 19:607-614.
- Page, B.D., Guedes, S., Waring, D., Priess, J.R.** (2001). The *C. elegans* E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling. *Mol Cell.* Mar;7(3):451-60.
- Parek, R.B., Tse, A.G., Dwek, R.A., Williams, A.F., Rademacher, T.W.** (1987). Tissue specific N-glycosylation, site specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition on rat Thy-1. *EMBO J.* May;6(5):1233-1244.
- Paulson J.C., Colley, K.J.** (1989). Glycosyltransferases. *J Biol Chem.* Oct 25;264(30):17615-17618.
- Perez-Alvarado, G.C, Miles, C., Michelsen, J.W., Louis, H.A., Winge, D.R., Beckerle, M.C., Summers, M.F.** (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat.Struct.Biol.* Jun;1(6):388-98.
- Perillo, N.L., Marcus, M.E., Baum, L.G.** (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med.* Mai;76(6):402-12.
- Pettitt, J., Cox, E.A., Broadbent, I.D., Flett, A. and Hardin, J.** (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *J. Cell Biol.* 162, 15-22.
- Phizicky, E.M., Fields, S.** (1995). Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiological Reviews*, 94-123.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* Jul;24(3):218-29.
- Rastinejad, F., Blau, H.M.** (1993). Genetic complementation reveals a novel regulatory role for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell* March 26;72:903-917.
- Robertson, S.M., Shetty, P., Lin, R.** (2004). Identification of lineage-specific zygotic transcripts in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev Biol.* Dec 15;276(2):493-507.
- Rogalski, T.M., Gilbert, M.M., Devenport, D., Norman, K.R., Moerman, D.G.** (2003). DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. *Genetics.* Mar;163(3):905-15.

- Roger, B.D., Drickamer, K.** (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*. 11(5):71R-79R.
- Salser, S.J., Kenyon, C.** (1994). Patterning *C. elegans*: homeotic cluster genes, cell fates and cell migrations. *Trends Genetics*, 10:159-164.
- Sango, K., Tokashiki, A., Ajiki, K., Horie, M., Kawano, H., Watabe, K., Horie, H., Kadoya, T.** (2004). Synthesis, localization and externalization of galectin-1 in mature dorsal root ganglion neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci*. Jan;19(1):55-64.
- Sato, S., Hughes, R.C.** (1994). Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 269, 4424-30 .
- Schiff, M., Froissant, R., Olsen, R.K., Acquaviva, C., Vianey-Saban, C.** (2006). Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol. Genet. Metab.* Jun;88(2):153-8.
- Schnabel, H., Bauer, G., Schnabel, R.** (1991). Suppressors of the organ-specific differentiation gene *pha-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. Sep;129(1):69-77.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D., Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol*. Apr 15;184(2):234-65.
- Schnabel, R., Bischoff, M., Hintze, A., Schulz, A.K., Hejnol, A., Meinhardt, H., Hutter, H.** (2006). Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation. *Dev Biol*. Jun 15;294(2):418-31.
- Schulz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K., Bork, P.** (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci*. Jan;6(1):249-53.
- Scott, K., Weinberg, C.** (2004). Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. *Glycocon J*. 19;467-477.
- Shelton, C.A., Bowermann, B.** (1996). Time-dependent responses to *glp-1*-mediated inductions in the early *C. elegans* embryo. *Development*. Jul;122(7):2043-50.
- Shoji, H., Nishi, N., Hiroshima, M., Nakamura, T.** (2003). Characterization of the *Xenopus* Galectin Family. *J Biol Chem*. Apr. 4;278(4):12285-12293.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D., Sheu, S.S.** (2006). The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr. Pharm. Des.* 12(18):2249-70.
- Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B.** (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect. Immun.* Apr;71(4):2208-17.
- Speliotes, E.K., Uren, A., Vaux, D., Horvitz, H.R.** (2000). The Survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol. Cell*. 6(211-223).
- Spieth, J., Blumenthal, T.** (1985). The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Mol Cell Biol*. Okt;5(10):2495-501.
- Steinberg, M.S.** (1963). Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science* 141, 401-408.
- Stonebraker, J.R., Wagner, D., Letensty, R.W., Burns, K., Gendler, S.J., Bergelson, J.M., Boucher, R.C., O'Neal, W.K., Pickles, R.J.** (2004). Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium *in vitro*: role for tethered mucins as barriers to lumenal infection. *J Virol*. Dec;78(24):13755-68.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.*;100:64-119.
- Suzuki, K., Takahashi, K.** (2003). Reduced Cell Adhesion During Mitosis by Threonine Phosphorylation of  $\beta 1$  Integrin. *J.Cell. Phys.* 197:297-305.
- Sym, M., Robinson, N., Kenyon, C.** (1999). MIG-13 positions migrating cells along the anteroposterior body axis of *C. elegans*. *Cell* 98:25-36. 34.
- Takahashi, Y., Yamaoka, K., Nishikawa, M., Takakura, Y.** (2006). Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnol Bioeng.* Mar 5;93(4):816-9.



- Tenenhaus, C., Schubert, C., Seydoux, G.** (1998). Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* Aug 15;200(2):212-24.
- Van Criekeing, W., Beyaert, R.** (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol proced Online.* Oct 4;2:1-38.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Du, S.J., Henrikson, D.** (2004). Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycocon. J.* 21:503-521.
- Vatcher, G., Thacker, C.M., Kalette, T., Schnabel, H., Schnabel, R., Baillie, D.L.** (1998). Serine Hydroxymethyltransferase is maternally essential in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* Mar 13;273(11):6066-6073.
- Walsh, F.S., Parekh, R.B., Moore, S.E., Dickson, G., Barton, C.H., Gower, H.J., Dwek, R.A., Rademacher, T.W.** (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development.* 105(4):803-811.
- Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B.R., Crabtree, G.R.** (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* Sep 1;10(17):2117-30.
- Wells, C., Davies, D., Mallucci, L** (1999). Cell cycle arrest and induction of apoptosis by b-galactose-binding protein (bGBP) in human mammary cancer cells. A potential new approach to cancer control. *Eur J Immunol* 35:978-83.
- Williams-Masson, E.M., Malik, A.N. and Hardin, J.** (1997). A mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* 124, 2889-2901.
- Wilm, T.P.** (1998). Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen des maternal wirkenden Gens *sud-1* in *Caenorhabditis elegans*. Dissertation, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wolf, F.W., Hung, M.-S., Wightman, B., Way, J., Garriga, G.** (1998). *vab-8* is a key regulator of posteriorly directed migrations in *C. elegans* and encodes a novel protein with kinesin motor similarity. *Neuron*, 20:655-666.
- Wolpert, L.** (1994). Positional information and pattern formation in development. *Dev Genet.* 15(6):485-90.
- Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, Y., Yin, Z.** (2006). Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Onkogene* Apr 24, in press.
- Yamaguchi, R., Mazaki Y., Hirota K., Hashimoto S., Sabe H.** (1997). Mitosis specific serine phosphorylation and downregulation of one of the focal adhesion protein, paxillin. *Onkogene* Okt 9;15(15):1753-61.
- Yoshii, T., Fukumori, T., Honjo, Y., Inohara, H., Choi Kim, H.-R., Raz, A.** (2002). Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol. Chem.* März 1;277(9):6852-6857.
- Young, Y., Lundquist, E.A.** (2005). The actin-binding protein UNC-115/abLIM controls formation of lamellipodia and filopodia and neuronal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*.
- Zhu, S., Hanneman, A., Reinhold, V.N., Spence, A.M., Schachter, H.** (2004). *Caenorhabditis elegans* triple null mutant lacking UDP-N-acetyl-D-glucosamine:alpha-3-D-mannoside beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Biochem J.* Sep 15;382(Pt 3):995-1001.
- Zick, Y., Eisenstein, M., Gore, R.A., Hadari, Y.R., Levy, Y., Ronen, D.** (2004). Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth.
- Zubieta, M.R., Furman, D., Barrio, M., Bravo, A.I., Domenichini, E., Mordoh, J.** (2006). Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol.* 168(5):1666-75.

## Anhang

### Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ade	Adenin
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
BME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cat. Nr.	Katalognummer
cm	Zentimeter
const.	konstant
DMFO	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	destilliertes Wasser
His	Histidin
Kan	Kanamycin
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat
kD	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Broth Medium
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
M	molar
mA	Milliampere
Mg	Magnesium
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
NaAz	Natriumazit
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat buffered saline
PCIA	Phenylchloroformisoamylalkohol
PFA	Paraformaldehyd

PMSF	PHenylmethyl-sulfonyl Fluorid
RNA	Ribosenukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
SD	Syntetic Dropout Medium
SDS	Natriumdodecylsulphat
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris/EDTA
Trp	Tryptophan
U	unit
upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vvm	Volumen pro Volumen pro Minute
YAC	Yeast Artificial Chromosome
YPD	Hefe-Vollmedium (Yeast-Peptide-Dextrose)

## Primerliste

Sequenzierprimer für pCR4-TOPO und pCRII-TOPO

**CE 041:** 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

**CE 042:** 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Amplifizieren der Interaktionsklone für RNAi aus p $\lambda$ ACT

**CE1726:** 5'-AGATGGTGCACGATGCACAG

Korrektur des ORF von *sud-1*/cDNAfl, -fh

**CE1734:** 5'-GTCCGCGCCGCAACATATGAATAATCCAGAAGAAAG  
CGCTGTAACAGATCTCCG-3'

**sud1Pr1:** 5'-CAGTTCTTTCCAGCGGTAATA-3'

Sequenzierung in pASK-IBA-Vektoren

**CE1838:** 5'-GAGTTATTTTACCACTCCCT-3'

**CE1839:** 5'-CGCAGTAGCGGTAAACG-3'

Klonierung von *sud-1*/cDNAsh in pGBKT7

**CE1840:** 5'-ATCATATGACATGCAGGCACTTGATCGATGAG-3'

**CE946:** 5'-ATAATACCCGGGTCAACGACGAGTCCATTCACTGC-3'

Korrektur des ORF von *sud-1*/cDNAfl in pASK-IBA43+

**CE1857:** 5'-ATGGTACCATGAATAATCCAGAAGAAAGCGCTGTAACA  
GATCTCCG-3'

Sequenzierung der Interaktionskandidaten Y2H in p $\lambda$ ACT, Amplifizieren der Y2H-Kandidaten für RNAi aus cDNA-Bank

**CE1908:** 5'-TACCACTACAATGGATG-3'

**CE1985:** 5'-ATGATCGGAGGAGGAATCGG-3'

**CE1986:** 5'-TTAGTGAGAAACATGGGCGG-3'

**CE1987:** 5'- TGTATGTTATTGAAAACCCG -3'  
**CE1988:** 5'- TTTGTCACGGTATCATATGC -3'  
**CE1989:** 5'- ATGCATACCATTAATAGCCC -3'  
**CE1990:** 5'- TTAGAAGTAGGCGTTGTAGG -3'  
**CE1991:** 5'- AATTCTCAATCCATCAGTCC -3'  
**CE1992:** 5'- TTTCTTCGAGATTGATAGC -3'  
**CE1993:** 5'- ATGCACTCCTATCACAACCC -3'  
**CE1994:** 5'- TGTATGGGTTGAAGTTTTGG -3'  
**CE1995:** 5'- CACGTCATTGAAAATCCACC -3'  
**CE1996:** 5'- AATAGTGATGGTGACGGTGG -3'  
**CE2036:** 5'- GCTCAAATACAGGGAAACCG -3'  
**CE2037:** 5'- GAAGGAAGAAATCACGACGC -3'

Amplifizieren von TAP-tag aus pFA6a

**CE2064:** 5'-ATACTAGTATGAAGCGACGATGGAAAAAG-3'  
**CE2065:** 5'-ATAGATCTTTATTCTTTGCTCACCGAAGG-3'

Sequenzierung cTAP

**CAB 05:** 5'-CTCAACATGCGATTAAGGGTG-3'  
**CAB 06:** 5'-CACCCCTTAATCGCATGTTGAG-3'  
**CE2102:** 5'-GCCTCGACATCATCTGCCAG-3'  
**CE2104:** 5'-CGAAGAACAACGCAATGG-3'  
**CE2105:** 5'-CGCTAACCTTTTAGCAGAAGC-3'  
**CE2201:** 5'-CTTTGCTCACCGAAGGATCG-3'

Amplifizieren der cTAP-Kan<sup>R</sup>-Cassette aus pHE601

**CE2153:** 5'-ATGGGCCCCATGAAGCGACGATGGAAAAAG-3'  
**CE2154:** 5'-ATGCGGCCGCGCTCGTTTTTCGACACTGGATG-3'

Nachweis des *sud-1*-cTAP-Konstruktes

**sud1P7:** 5'-GCACCCAGAGAACGAGAGAAT-3'  
**sud1Pr8:** 5'-GTTTCGGTGGTGGTTTTGGAG-3'  
**sud1P9:** 5'-TCAATGACCCGCCAAACCCGC-3'  
**sud1P0:** 5'-ACCTCGTTATCTACCTGAATG-3'  
**sud1Pr0:** 5'-CATTCAGGTAGATAAGCAGGT-3'  
**sud1P1:** 5'-TATTACCGCTGGAAAGAACTG-3'  
**sud1Pr1:** 5'-CAGTTCTTTCCAGCGGTAATA-3'  
**sud1P1-2:** 5'-GCGCCAAGAATCCTGACTACA-3'  
**sud1Pr1-2:** 5'-TGTAGTCAGGATTCTTGGCGC-3'  
**sud1P2:** 5'-TCGGGTGTACTGCCTTGTCTC-3'  
**sud1Pr2:** 5'-GAGACAAGGCAGTACACCCGA-3'  
**sud1P2-3:** 5'-TCCTGCTGATTTGCGTTGATA-3'  
**sud1Pr2-3:** 5'-TATCAACGCAAATCAGCAGGA-3'  
**sud1P3:** 5'-AAATGCTGCAATGATGACAAT-3'  
**sud1Pr3:** 5'-ATTGTCATCATTGCAGCATTT-3'  
**sud1P3-4:** 5'-CCAATTCTCTTCGTCTTTCTT-3'  
**sud1Pr3-4:** 5'-AAGAAAGACGAAGAGAATTGG-3'  
**sud1P4:** 5'-AGAATCCAAAAAACAAGTCC-3'  
**sud1Pr4:** 5'-GGACTTGTTTTTTTGGATTCT-3'

**sud1P4-5:** 5'-ATTTGAGTCGTCAGTGGTTGA-3'  
**sud1Pr4-5:** 5'-TCAACCACTGACGACTCAAAT-3'  
**sud1P5:** 5'-CATACTTGTACTTTTCATGGC-3'  
**sud1Pr5:** 5'-GCCATGAAAAGTACAAGTATG-3'  
**sud1P5-6:** 5'-TCTTTTGTCTCTACTCCAGG-3'  
**sud1Pr5-6:** 5'-CCTGGAGTAGAGAACAAAAGA-3'  
**sud1P6:** 5'-TCGCAGAAGTTTTTAGCCAAG-3'  
**sud1Pr6:** 5'-CTTGGCTAAAACTTCTGCGA-3'  
**sud1P6-7:** 5'-CGTACAATTCAAATGGAGGAG-3'  
**sud1Pr6-7:** 5'-CTCCTCCATTTGAATTGTACG-3'  
**sud1P7:** 5'-GCACCCAGAGAACGAGAGAAT-3'  
**sud1Pr7:** 5'-ATTCTCTCGTTCTCTGGGTGC-3'  
**sud1P8:** 5'-GTTTCGGTGGTGGTTTTGGAG-3'  
**sud1Pr8:** 5'-CTCCAAAACCACCACCGAAAC-3'  
**sud1P9:** 5'-TCAATGACCCGCCAAACCCGC-3'  
**sud1Pr9:** 5'-GCGGGTTTGGCGGGTCATTGA-3'  
**sud1-P(utr5'):** 5'-CTCTCCGCTCTCTTCGTCTCT-3'  
**sud1-P(utr3'):** 5'-TATTGTTAGCCATTCAGCAGA-3'

## Tabellen

**Tab. T1:** verwendete Embryonen

Zelllinienanalysen			
Embryo	Name Videofile (=Backup file)	Name Lineagefile	Datenbank-Nr.
Wildtyp	RS_N2_2a	RS_N2_2a	n.n.
<i>sud-1</i> #1	MM_SU42sc1_bu	MM_SU42A1_2.lineage4.3.04 _neu_aufgefüllt	2 a, b, c
<i>sud-1</i> #2	MM_sud1_142_6	MM_sud1_142_6	89 a, b, c
<i>sud-1-glp1-1</i> #1	MM_sud-1-glp-1_F #47A3	MM_sud-1-glp-1_F	146
<i>sud-1-glp1-1</i> #2	MM_sud-1-glp-1_G #47A3	MM_sud-1-glp-1_G	216
lec-1,2,4-AL	MM_N2RNAilec124A	MM_N2RNAilec124AL	156
MM_lec-1,2,4D_Mitte	MM_N2RNAilec124D	MM_N2RNAilec124D_Mitte #1	201
MM_lec-1,2DL	MM_N2RNAilec12D	MM_N2RNAilec12DL	164
Experiment	Zellmigrationen		
lec-1-4 in Wt	N2_Lec1-4	N2-lec1-4_links	139
lec-1-4 in Wt	MM_N2RNAilec1-4B	MM_N2RNAilec1-4B2	165 (177)
lec1-4 in sud	MM_sudRNAilec1-4A	MM_sudRNAilec1-4AL	155
lec-3 in wt	MM_N2RNAilec3A	MM_N2RNAilec3AL	191
lec-3 in wt	MM_N2RNAilec3A	MM_N2RNAilec3AR	191
lec-3 in wt	SK_lec-3_RNAi-N2	SK_lec-3_RNAi-N2links	175
lec-3 in sud	MM_lec3RNAi-t1242	MM_lec3RNAi-t1242	227
lec-3 in sud	MM_sud-RNAi-lec-3C	sud-1-lec-3c	161
lec-3 in sud	MM_lec-3RNAi_t1242,L,R	MM_lec3RNAi_t1242R	145
t1099	MM_t1099	MM_t1099_1	229
t1099	MM_t1099		230
t1115_t1099	MM_t1115_t1099_1	MM_t1115_t1099_1	228
t1115_t1099	MM_t1115_t1099_3	MM_t1115_t1099_3	226
t1115_t1099	MM_t1115_t1099_4	MM_t1115_t1099_4	226
t1115_t1099	MM_t1115_t1099_5	MM_t1115_t1099_5	226
lec-1,2 in wt	MM_N2RNAilec12D	MM_N2RNAilec12DL	164
lec-1,2 in wt	MM_N2RNAilec12D	MM_N2RNAilec12DR	164
lec-1,2,4 in wt	MM_N2RNAilec124D	MM_N2RNAilec124D_Mitte	201
lec-1,2,4 in wt	MM_N2RNAilec124A	MM_N2RNAilec124AL	156
sud-1 [AB] + Wt [P <sub>2</sub> ]	MMAB+P2_sud-1_N2_1	MMAB+P2_sud-1_N2_1	95
sud-1 [AB] + Wt [P <sub>2</sub> ]	MMAB+P2_sud-1_N2_4	MMAB+P2_sud-1_N2_4	99 a, b, c
sud-1 [AB] + Wt [P <sub>2</sub> ]	MMAB+P2_sud-1_N2_6	MMAB+P2_sud-1_N2_6	93 a, b
Wt [AB] + sud-1 [P <sub>2</sub> ]	MMAB+P2_N2_sud-1_1	MMAB+P2_N2_sud-1_1	90 a, b, c
sud-1 entschalt	MMAB+P2_sud-1_6a	MMAB+P2_sud-1_6a	91 a, b, c

**Tab. T2:** Werte zur Berechnung der Kalibrierkurve: tatsächliche Zellzahl – Zellen am Rand des Embryo.

tatsächliche Zellzahl		12	26	44	50	100	200	300	378	400	518	670	693	715	740
gezählte Zellzahl	Emb#1				18	21	29	34	37	37					
	Emb#2				19	24	28	36	38	37					
	Emb#5				19	22	27	32	37	37					
	N2-dig_2a	8	14	17	19	24	28	36	38	38					
	IB+RS_N2				16	23	28	35		41					
	MM_sud_42sc1		14	17	18,2	22,8	28		37		44	52	55	56	58
	Mittelwert	8	14	17	18,2	22,8	28	34,6	37,4	38	44	52	55	56	58

Die folgenden gezählten Zellzahlen und ihre Werte der tatsächlichen Zellzahl weichen von der Kalibrierkurve ab:

**Tab. T3:** von der Kalibrierkurve abweichende Zellzahlen.

tatsächliche Zellzahl	13	15	20	23	26	33	40	44
gezählte Zellzahl	10	11	12	13	14	15	16	17

**Tab. T4:** gezählte Zellzahlen in Embryonen nach RNAi gegen *lec-1* + *lec-2*.

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer						
	n (36h)	n (39h)	n (42,5h)	n (44h)	n (46h)	n (49h)	n (52)
33	27	26	21	15	17	20	17
36	30	31	24	17	18	21	18
37	32	31	24	18	20	21	18
38	32	33	25	19	21	23	19
38	33	33	25	20	23	23	21
	34	37	26	20	23	23	22
	35	37	26	21	23	23	22
	35	40	26	22	23	24	22
	36	40	27	22	23	24	24
	37	41	27	22	24	24	24
	37	46	28	22	25	25	24
	37	50	28	23	26	25	24
	37	51	30	23	26	25	24
	37		30	24	28	25	25
	37		35	25	29	26	25
	37		38	25	29	26	25
	37		40	26	29	27	26
	38		43	26	29	28	26
	38		46	27	30	28	26
	38		50	27	31	29	26
	39			27	32	30	26
	39			28	32	30	26
	40			28	33	30	26
	41			29	34	30	26
	42			29	41	30	26
	42			29		30	26

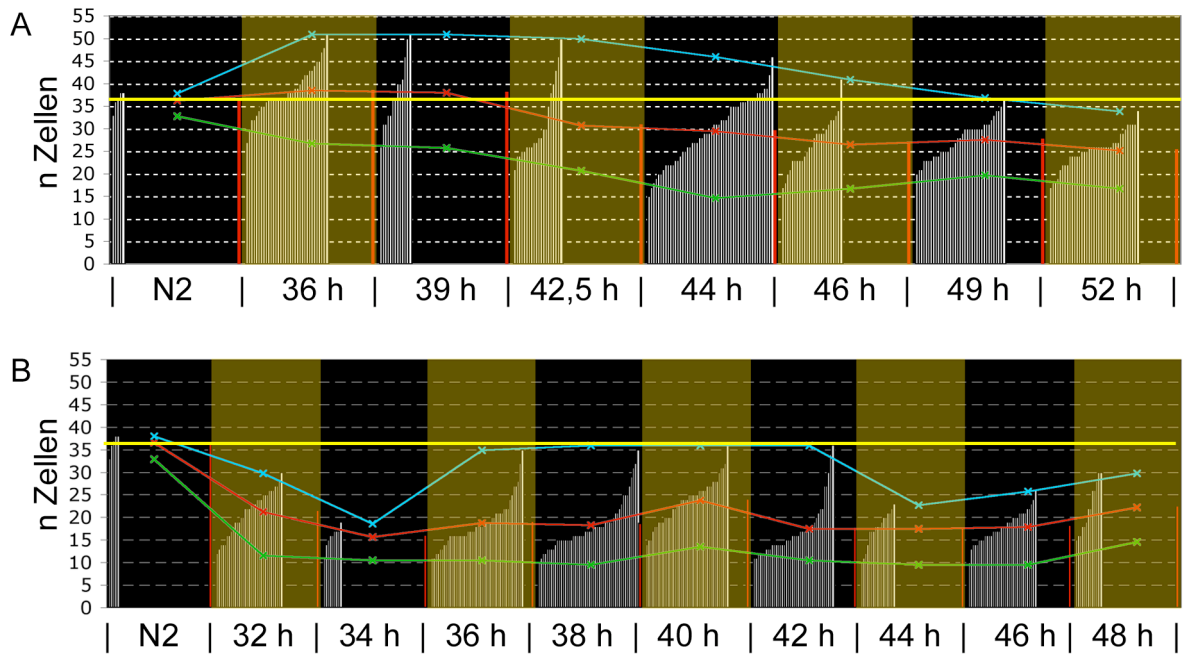
**Tab. T4: Fortsetzung.**

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer						
	n (36h)	n (39h)	n (42,5h)	n (44h)	n (46h)	n (49h)	n (52)
	43			30		30	27
	43			31		30	27
	44			31		31	27
	45			31		31	29
	45			32		31	29
	47			32		32	30
	48			32		33	31
	51			33		34	31
				35		34	31
				35		35	31
				35		37	34
				35			
				36			
				36			
				36			
				37			
				37			
				37			
				37			
				38			
				38			
				38			
				39			
				39			
				42			
				46			
Mittelwerte							
36,40	38,62	38,15	30,95	29,65	26,76	27,78	25,43



**Abb. A7:** Kalibrierkurve und dazugehörige Kurvenfunktion zur Umrechnung der gezählten Zellzahl in die tatsächliche Zellzahl. Die entsprechenden Werte der Kalibrierkurve siehe im Anhang (Tab. A2, A3).





**Abb. A8:** Graphische Darstellung der Zeitkurven. Dargestellt ist zu jedem Zeitpunkt die Anzahl der gezählten Zellen in den Embryos nach RNAi gegen LEC-1 und LEC-2 (A) und LEC-1 (B). Jeder weiße Balken stellt die Zellzahl eines Embryos dar. Blaue Kurve: maximale Zellzahlen, rote Kurve, gemittelte Zellzahlen, grüne Kurve: minimale Zellzahlen. Gelbe Linie: gemittelte Zellzahl im Wildtyp ohne RNAi.

**Tab. T5:** mit der Kalibrierkurve berechnete Zellzahlen in Embryonen nach RNAi gegen *lec-1* + *lec-2*.

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer						
	n (36h)	n (39h)	n (42,5h)	n (44h)	n (46h)	n (49h)	n (52)
289,02	174,70	157,51	82,77	25,01	39,74	70,45	39,74
350,89	229,80	249,15	125,20	39,74	48,88	82,77	48,88
371,84	268,91	249,15	125,20	48,88	70,45	82,77	48,88
392,88	268,91	289,02	140,99	59,14	82,77	110,20	59,14
392,88	289,02	289,02	140,99	70,45	110,20	110,20	82,77
	309,42	371,84	157,51	70,45	110,20	110,20	96,04
	330,06	371,84	157,51	82,77	110,20	110,20	96,04
	330,06	434,95	157,51	96,04	110,20	125,20	96,04
	350,89	434,95	174,70	96,04	110,20	125,20	125,20
	371,84	455,88	174,70	96,04	125,20	125,20	125,20
	371,84	557,31	192,52	96,04	140,99	140,99	125,20
	371,84	631,30	192,52	110,20	157,51	140,99	125,20
	371,84	648,35	229,80	110,20	157,51	140,99	125,20
	371,84		229,80	125,20	192,52	140,99	140,99
	371,84		330,06	140,99	210,90	157,51	140,99

**Tab. T5: Fortsetzung.**

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer						
	n (36h)	n (39h)	n (42,5h)	n (44h)	n (46h)	n (49h)	n (52)
	371,84		392,88	140,99	210,90	157,51	140,99
	371,84		434,95	157,51	210,90	174,70	157,51
	392,88		497,26	157,51	210,90	192,52	157,51
	392,88		557,31	174,70	229,80	192,52	157,51
	392,88		631,30	174,70	249,15	210,90	157,51
	413,93			174,70	268,91	229,80	157,51
	413,93			192,52	268,91	229,80	157,51
	434,95			192,52	289,02	229,80	157,51
	455,88			210,90	309,42	229,80	157,51
	476,67			210,90	455,88	229,80	157,51
	476,67			210,90		229,80	157,51
	497,26			229,80		229,80	174,70
	497,26			249,15		229,80	174,70
	517,60			249,15		249,15	174,70
	537,64			249,15		249,15	210,90
	537,64			268,91		249,15	210,90
	576,57			268,91		268,91	229,80
	595,35			268,91		289,02	249,15
	648,35			289,02		309,42	249,15
				330,06		309,42	249,15
				330,06		330,06	249,15
				330,06		371,84	309,42
				330,06			
				350,89			
				350,89			
				350,89			
				371,84			
				371,84			
				371,84			
				371,84			
				392,88			
				392,88			
				392,88			
				413,93			
				413,93			
				476,67			
<b>Mittelwerte</b>							
365,06	412,38	413,47	274,13	235,36	189,89	198,38	157,44

**Tab. T6: gezählte Zellzahlen in Embryonen nach RNAi gegen *lec-1*.**

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer								
	n (32h)	n (34h)	n (36h)	n (38h)	n (40h)	n (42h)	n (44h)	n (46h)	n (48h)
33	12	11	11	10	14	11	10	10	15
36	13	14	11	11	15	11	11	13	16
37	14	15	12	12	15	12	12	14	16
38	14	16	12	12	17	12	14	14	18
38	14	16	13	13	18	12	17	14	18
	16	17	13	13	18	12	17	15	19
	16	17	14	13	19	13	17	15	22

Tab. T6: Fortsetzung.

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer								
	17	17	14	13	19	13	18	15	22
	18	19	15	14	19	13	18	16	26
	19		16	15	20	14	18	16	26
	19		16	15	20	14	19	16	28
	19		16	15	20	14	20	16	30
	20		16	15	20	14	20	17	30
	20		16	15	22	14	21	17	
	22		16	15	22	14	21	17	
	22		16	15	23	14	22	17	
	22		16	15	23	15	23	18	
	23		16	16	24	15		18	
	23		17	16	24	15		18	
	23		17	16	24	16		19	
	24		17	16	24	16		19	
	24		17	16	25	16		19	
	24		18	16	25	16		20	
	25		18	17	25	17		20	
	25		18	17	25	17		20	
	25		18	17	25	17		21	
	26		19	17	26	17		21	
	26		19	18	26	17		21	
	26		19	18	26	18		21	
	27		19	18	26	18		22	
	27		20	18	27	19		22	
	28		20	18	27	20		23	
	30		21	18	27	21		24	
			21	19	28	22		26	
			21	19	28	22			
			21	19	28	27			
			22	19	30	27			
			22	20	31	30			
			22	21	31	34			
			24	22	32	36			
			25	23	36				
			27	25					
			27	25					
			28	25					
			32	27					
			35	29					
				31					
				32					
				35					
Mittelwert									
36,67	21,56	16,10	19,11	18,65	24,05	17,83	17,83	18,29	22,57

**Tab. T7:** mit der Kalibrierkurve berechnete Zellzahlen in Embryonen nach RNAi gegen *lec-1*.

Wildtyp	Embryonen nach angegebener RNAi Dauer								
	n (32h)	n (34h)	n (36h)	n (38h)	n (40h)	n (42h)	n (44h)	n (46h)	n (48h)
289,02	20,00	15,00	15,00	13,00	26,00	15,00	13,00	13,00	33,00
350,89	23,00	26,00	15,00	15,00	33,00	15,00	15,00	23,00	40,00
371,84	19,54	33,00	20,00	20,00	33,00	20,00	20,00	26,00	40,00
392,88	19,54	40,00	20,00	23,00	44,00	20,00	26,00	26,00	48,88
392,88	19,54	40,00	23,00	23,00	48,88	20,00	44,00	26,00	48,88
	31,76	39,74	23,00	23,00	48,88	20,00	44,00	33,00	59,14
	31,76	44,00	26,00	23,00	59,14	23,00	44,00	33,00	96,04
	39,74	44,00	26,00	23,00	59,14	23,00	48,88	33,00	96,04
	48,88	59,14	33,00	26,00	59,14	23,00	48,88	40,00	157,51
	59,14		40,00	33,00	70,45	26,00	48,88	40,00	157,51
	59,14		40,00	33,00	70,45	26,00	59,14	40,00	192,52
	59,14		40,00	33,00	70,45	26,00	70,45	40,00	229,80
	70,45		40,00	33,00	70,45	26,00	70,45	45,00	229,80
	70,45		40,00	33,00	96,04	26,00	82,77	45,00	
	96,04		40,00	33,00	96,04	26,00	82,77	45,00	
	96,04		40,00	33,00	110,20	26,00	96,04	45,00	
	96,04		40,00	33,00	110,20	33,00	110,20	48,88	
	110,20		40,00	40,00	125,20	33,00		48,88	
	110,20		44,00	40,00	125,20	33,00		48,88	
	110,20		44,00	40,00	125,20	40,00		59,14	
	125,20		44,00	40,00	125,20	40,00		59,14	
	125,20		44,00	40,00	140,99	40,00		59,14	
	125,20		48,88	40,00	140,99	40,00		70,45	
	140,99		48,88	44,00	140,99	44,00		70,45	
	140,99		48,88	44,00	140,99	44,00		70,45	
	140,99		48,88	44,00	140,99	44,00		82,77	
	157,51		59,14	44,00	157,51	44,00		82,77	
	157,51		59,14	48,88	157,51	44,00		82,77	
	157,51		59,14	48,88	157,51	48,88		82,77	
	174,70		59,14	48,88	157,51	48,88		96,04	
	174,70		70,45	48,88	174,70	59,14		96,04	
	192,52		70,45	48,88	174,70	70,45		110,20	
	229,80		82,77	48,88	174,70	82,77		125,20	
			82,77	59,14	192,52	96,04		157,51	
			82,77	59,14	192,52	96,04			
			82,77	59,14	192,52	174,70			
			96,04	59,14	229,80	174,70			
			96,04	70,45	249,15	229,80			
			96,04	82,77	249,15	309,42			
			125,20	82,77	268,91	350,89			
			140,99	96,04	350,89				
			174,70	110,20					
			174,70	140,99					
			192,52	140,99					
			268,91	140,99					
			330,06	174,70					
				210,90					
				249,15					

**Tab. T7:** Fortsetzung.

				268,91					
				330,06					
				350,89					
<b>Mittelwerte</b>									
365,06	101,86	40,00	78,01	80,76	136,71	71,53	57,48	61,77	118,49

**Tab. T8:** gezählte 3NB12-gefärbte Zellen für t-Test der terminalen Differenzierung von *t1115*, *t1099* und *t1115–t1099*.

<i>t1115</i>		<i>t1099</i>		<i>t1115 – t1099</i>			
1	4	1	16	1	7	9	14
1	4	1	19	1	7	9	15
1	5	1	21	3	7	9	16
1	5	1	21	3	7	9	16
1	5	2	21	3	7	9	17
1	5	2	21	3	7	9	17
1	5	2	21	3	7	9	17
2	5	2	21	3	7	10	18
2	5	3	21	4	7	10	18
2	5	3	21	4	7	10	19
2	5	4	21	4	7	10	20
2	5	4	21	4	7	10	20
2	5	5	21	4	7	10	21
2	6	5	21	5	7	10	21
2	6	5	21	5	7	10	21
2	6	6	21	5	8	10	21
2	6	6	21	5	8	10	21
2	6	6	21	5	8	10	21
2	6	6	21	5	8	10	21
2	6	6	21	5	8	10	21
2	7	6	21	5	8	10	21
3	7	6	21	5	8	11	21
3	7	7	21	5	8	11	21
3	8	7	21	5	8	11	21
3	8	8	21	5	8	11	21
3	8	8	21	5	8	11	21
3	9	8	21	6	8	11	21
3	9	8	21	6	8	11	21
3	9	8	21	6	8	12	21
3	9	8	21	6	8	12	21
3	10	8	21	6	8	12	21
3	10	8	21	6	8	12	
4	10	9	21	6	8	12	
4	11	9	21	6	9	12	
4	11	9	21	6	9	12	
4	12	11	16	6	9	12	
4	13	11	19	6	9	12	
4	14	11	21	6	9	13	
4		12	21	6	9	14	
4		13		6	9	14	
4		14		6	9	14	
4		16		7	9	14	

**Tab. T9:** Ergebnisse des Y2H Screens. Aufgelistet ist die Anzahl des jeweiligen Kandidaten (n), der Genname bzw. die Nummer des vorhergesagten ORF und die Funktion des Gens in *C. elegans*. Für Gene, deren Funktion in *C. elegans* noch nicht bekannt ist, sind die Homologen (Sequenzhomologien) anderer Organismen aufgeführt sowie deren Funktion.

n	Gen bzw vorhergesagter ORF	Funktion in <i>C. elegans</i>	Homologe in anderen Organismen	Funktion der Homologen	Referenz
44	<i>vig-1</i>	mRNA-Stoffwechsel bindet <i>let-7</i> miRNA	<i>D. m.</i> VIG-1	RNAi Mechanismus	Buckingham <i>et al.</i> 2004
20	<i>lec-2</i> Galectin	$\beta$ -Galactosidase bindendes Lectin	<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> , <i>X. l.</i> : Galectine	Steuerung von Proliferation, Apoptose, Zell Adhäsion	Perillo <i>et al.</i> 1998
10	<i>SUD-1</i> T21B10.3	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
6	ZK1128.5	N.N.	<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> : Swp73/BAF60	Regulation des Chromatinre- modelling im SWI/SNF Complex	Wang <i>et al.</i> 1996
5	<i>vit-6</i> Vitellogenin	Ei Dotter Protein			Spieth <i>et al.</i> 1985
5	C05C10.5a	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
4	B0001.8	N.N.	<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> : SRp75	splicingFaktor	Chen <i>et al.</i> 2006
4	<i>lec-3</i> Galectin	N.N.	<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> , <i>X. l.</i> : Galectine	Steuerung von Proliferation, A- poptose, Zell Adhäsion	Perillo <i>et al.</i> 1998
4	<i>dim-1</i> „disorganised muscle“	Struktur und Stabilität der Kör- permuskeln			Rogalski <i>et al.</i> 2003
3	<i>mel-46</i> maternal letal-46		<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> , <i>S. c.</i> : DDX20,	DEAD-Box Protein, ATP-abhängige RNA-Helicase, in- teragiert mit Egr- Transscriptionsfaktoren	Gillian <i>et al.</i> 2004
3	C23F12.1	Actin bindendes Protein	<i>M.m.</i> , <i>H. s.</i> , <i>G. g.</i> : FilaminA/ABP280	Architektur des Actin-Zytoskelettes	Luby-Phelps 1993
3	<i>dpl-1</i> Transcriptionsfaktor	Transcriptionsfaktor Asymmetrie des Embryos	<i>M.m.</i> , <i>H.s.</i> : DP-1	E2F Dimerisierungsfaktor	Page <i>et al.</i> 2001
2	<i>lec-5</i> Galectin	$\beta$ -Galactosidase bindendes Lec- tin	<i>M. m.</i> , <i>H. s.</i> , <i>X. l.</i> : Galectine	Steuerung von Proliferation, A- poptose, Zell Adhäsion	Perillo <i>et al.</i> 1998
2	ZK1055.6	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
2	<i>dhs-6</i> Protease Phosphatase	Zytokinese			Gruneberg <i>et al.</i> 2002
2	F37C4.5	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org

n	Gen bzw vorhergesagter ORF	Funktion in <i>C. elegans</i>	Homologe in anderen Organismen	Funktion der Homologen	Referenz
2	F35G12.12	N.N.	<i>M.m., H.s.</i> : 26S Proteasom Untereinheit 5	Abbau von ubiquitinylierten Proteinen	Bloom <i>et al.</i> 2006
2	F28F5.3a ( <i>tag-204</i> ) „temporarily assigned gene name“	N.N.	LIM-Domäne	Bindung von Zink Ionen	Perez-Alvarado <i>et al.</i> 1994
2	<i>pgn-46</i> „Prion ähnliche (Q/N-reiche) Domäne“-beinhaltendes Protein	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
2	T08G5.5	N.N.	<i>S.c.</i> : Vam6/Vps39	Aufbau von vacuolaren Strukturen	Nakamura <i>et al.</i> 1997
2	F49E2.5	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
2	Y66H1B2 - Filamin A	N.N.	Filamin/ABP280	Actin bindendes Protein	Li <i>et al.</i> 1999
2	<i>lec-1</i> Galectin	$\beta$ -Galactose bindendes Lectin	<i>M.m., H.s., X.l.</i> : Galectine	Steuerung von Proliferation, Apoptose, Zell Adhäsion	Perillo <i>et al.</i> 1998
2	K07H8.7	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
2	M02D8.1	N.N.	<i>H.s., M.m.</i> : Titin	Strukturprotein im Muskel	Ma <i>et al.</i> 2006
1	<i>vit-4</i> Vitellogenin	Ei Dotter Protein			Spieth <i>et al.</i> 1985
1	R144.2a	RNA bindendes Protein	<i>H.s., S.c.</i> : Pcf11	RNA Prozessing, 3'-Polyadenylierung	Hollingworth <i>et al.</i> 2006
1	<i>grd-6</i>	N.N.	<i>H.s.</i> : Mucin-2 Vorläufer	glycosyliertes Oberflächenprotein auf Epithelzellen	„Essentials of Glycobiology“ CSHL Press, 1999
1	<i>esp-8/nsy-1</i> MAPKKK	Pathogenabwehr			Sifri <i>et al.</i> 2003
1	<i>gei-17</i>	Regulation der DNA-Reparatur-Kontrolle			Holway <i>et al.</i> 2006
1	C11E4.6	N.N.	SAM-Domäne	Protein Interaktionen	Schulz <i>et al.</i> 1997
1	<i>lec-4</i> Galectin	$\beta$ -Galactose bindendes Lectin	<i>M.m., H.s., X.l.</i> : Galectine	Steuerung von Proliferation, Apoptose, Zell Adhäsion	Perillo <i>et al.</i> 1998
1	ZK1055.7	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
1	K02B9.1	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org
1	R05D3.6 ATP Synthase epsilon Kette	N.N.	<i>H.s., S.c.</i> : F1F0-ATP synthase	Energieübertragung und Membranpotential in Mitochondrien	Bornhovd <i>et al.</i> 2006

n	Gen bzw vorhergesagter ORF	Funktion in <i>C. elegans</i>	Homologe in anderen Organismen	Funktion der Homologen	Referenz
1	B0432.13 vorhergesagte E3 Ubiquitin-Ligase	N.N.	<i>H.s., M.m</i> TRAF-Domäne interagierendes Protein	Zelltod, TNF- $\alpha$ Signalweg	Wu <i>et al.</i> 2006
1	F27D4.1	N.N.	<i>H.s.</i> ETF A	mitochondrialer Elektronentransport	Schiff <i>et al.</i> 2006
1	T19D12.6	N.N.	<i>S.c.</i> Serin/Threonin Kinase	Phosphorylierung von Proteinen in Signalkaskaden	www.wormbase.org
1	C16C8.4	N.N.	Ubiquitin	Proteinmarkierung	Bowerman <i>et al.</i> 2006
1	<i>rsp-3</i>	splicing Faktor			
1	<i>cpl-1</i> Cathepsin L Cystein Protease	Eidotter-Metabolismus	Cathepsin L Cystein Protease		Britton <i>et al.</i> 2004
1	<i>vit-2</i> Vitellogenin	Ei Dotter Protein			Spieth <i>et al.</i> 1985
1	R05G6.7	N.N.	<i>H.s., S.c.</i> Anionenkanal Protein Porin-3		Shoshan-Barmatz <i>et al.</i> 2006
1	<i>egl-21</i> <i>egg laying defective</i>	Zink Carboxypeptidase			Jacob <i>et al.</i> 2003
1	Y55F3AM.13	N.N.	<i>S.c.</i> GTPase	Initiation der Transkription	www.wormbase.org
1	<i>myo-3</i>	Strukturpotein der Myosinketten			Ahnn <i>et al.</i> 1994
1	<i>ifb-2</i>	Intermediärfilament, Zytoskelett			Jenna <i>et al.</i> 2005
1	5F63	N.N.	N.N.	N.N.	www.wormbase.org



## ***curriculum vitae***

Matthias Müller  
 Nordstr. 30  
 38106 Braunschweig  
 0531-378206 (privat)  
 0531-391-5794 (dienstl.)  
 mat.mueller@tu-bs.de



Geburtsdatum	13.07.1977
Geburtsort	66663 Merzig
Familienstand	verheiratet

### ***Ausbildung:***

06/1996	Allgemeine Hochschulreife am Peter-Wust-Gymnasium in Merzig
07/1996 - 08/1996	Grundausbildung als Sanitäter im Luftwaffenausbildungsregiment in Roth
08/1996 - 09/1997	Wehrdienst beim Luftwaffenmusikkorps 1 in München
10/1997 – 05/2003	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig
08/1999	Vordiplom im Studienfach Biotechnologie
05/2003	Diplom im Studienfach Biotechnologie
01/2001 – 03/2001	Studienarbeit an der TU Braunschweig Institut für Genetik
11/2002 – 05/2003	Diplomarbeit an der TU Braunschweig, Institut für Genetik
seit 01.06.2003	Promotion an der TU Braunschweig, Institut für Genetik „Funktionelle Modulation der Zelladhäsion durch <i>sud-1</i> und Galectine im <i>Caenorhabditis elegans</i> embryo.“

### ***Zusätzliche Praktika während des Studiums:***

08/1999 - 09/1999	an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig, Abteilung „Mikrobielle Ökologie“
11/1999 – 12/2000	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig, Abteilung „Genregulation und Differenzierung“
09/2000 – 10/2000	am Biozentrum der Universität Basel, Abteilung Zellbiologie

### ***Verantwortlichkeiten während der Promotion:***

- Betreuung von einzelnen Studenten in Laborpraktika
- Betreuung von kleinen Studentengruppen (10-12 Personen) in Blockpraktika
- universitäre Lehre im Rahmen eines Genetik-Tutoriums für Biotechnologen

### ***Tagungsbeiträge:***

- What is the function of *sud-1*? Müller, M., Schnabel, R. (2003)  
 14. International *C. elegans* Meeting, Los Angeles